

Institut für Biologie
der
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH
München
Geschäftsführender Vorstand: Professor Dr.med. Otto Hug

Die Bedeutung der Bandenfärbung für die Analyse
strahleninduzierter Chromosomenaberrationen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt

von

Gerhild Götz

aus Würzburg

1977

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.1977

Sondervotum: Prof. Dr.M.Bauchinger

1.Berichterstatter: Prof. Dr.F.Kaudewitz

2.Berichterstatter: Prof. Dr.H.Cleve

Institut für Biologie
der
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH
München
Geschäftsführender Vorstand: Professor Dr.med. Otto Hug

Die Bedeutung der Bandenfärbung für die Analyse
strahleninduzierter Chromosomenaberrationen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt

von

Gerhild Götz

aus Würzburg

1977

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.1977



Sondervotum: Prof. Dr.M.Bauchinger

1.Berichterstatter: Prof. Dr.F.Kaudewitz

2.Berichterstatter: Prof. Dr.H.Cleve

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methode	5
2.1. Material	5
2.2. Methode	5
2.2.1. Bestrahlungsbedingungen	5
2.2.2. Blutkultur	6
2.2.3. Chromosomenpräparation	6
2.2.4. Bandenfärbung	7
2.2.5. Mikroskopische Technik	8
2.2.6. Auswertung	8
3. Ergebnisse	9
3.1. Methodik	9
3.1.1. Chromosomenpräparation	9
3.1.2. Bandenfärbung	11
3.1.3. Charakteristisches Bandenmuster	12
3.2. Bestrahlungsversuche	16
3.2.1. Aberrationstypen	16
3.2.2. Dosis-Wirkungsbeziehung	35
3.2.3. Bruchstellenverteilung	38
3.2.3.1. Brüche in den Chromosomen	38
3.2.3.2. Brüche in den Chromosomenarmen	51
3.2.3.3. Brüche in den Regionen	54
3.2.3.4. Brüche in den Banden	54

4.	Diskussion	59
4.1.	Methodik	59
4.1.1.	Chromosomenpräparation	60
4.1.2.	Bandenfärbung	62
4.1.3.	Charakteristisches Bandenmuster	65
4.1.4.	Hypothesen zum Mechanismus der Bandenfärbung	71
4.2.	Bestrahlungsversuche	73
4.2.1.	Aberrationstypen	73
4.2.2.	Dosis-Wirkungsbeziehung	76
4.2.3.	Bruchstellenverteilung	78
4.3.	Die Anwendung der Bandenfärbung für eine "biologische Dosimetrie"	83
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis	89

Herrn Professor Dr.Hug danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, Herrn Professor Dr.Kaudewitz und Herrn Professor Dr.Cleve für die Berichterstattung.

Frau G.Rocznik hat die Fotoarbeiten mit großer Sorgfalt ausgeführt, wofür ich herzlich danke.

Dank gilt auch meiner Schwester, Frau S.Schwaiger, für die Hilfe bei den Laborarbeiten und Herrn Diplomphysiker W.Mergenthaler für die Beratung bei den statistischen Berechnungen.

Besonders verpflichtet bin ich Herrn Professor Dr.M.Bauchinger für die Themenstellung und die hilfreiche Unterstützung. Ich danke ihm für seine Ermutigung und seine Geduld.

Meinen Eltern und Sigi

1. EINLEITUNG

Die Gefahren der Umwelteinflüsse, die in zunehmendem Maß den Organismus des Menschen belasten, sind in den letzten Jahren immer weiteren Bevölkerungskreisen bewußt geworden. Insbesondere kommt der Veränderung des genetischen Materials durch Strahlen und durch Chemikalien eine wachsende Bedeutung zu.

Strahlen und eine Vielzahl chemischer Umweltnoxen können in verschiedenen Zellsystemen von Pflanzen, Tieren und Menschen Chromosomenschäden verursachen. Veränderungen an der Chromosomenstruktur und der typischen Chromosomenzahl sind somit qualitative Indikatoren für die Einwirkung dieser Noxen. Chromosomenaberrationen können aber auch als quantitativer biologischer Indikator dienen.

Schon 1962 hatten BENDER und GOOCH (9) vorgeschlagen, Chromosomendefekte in menschlichen peripheren Lymphozyten, als quantitatives Maß für eine Strahlenbelastung zu verwenden. Seither ist man bemüht, die Chromosomenanalyse für eine "biologische Dosimetrie" nutzbar zu machen. Dies wäre insbesondere für eine exakte Strahlenschutzüberwachung beruflich exponierter Personen oder für eine Dosisabschätzung nach Strahlenunfällen von Bedeutung.

Die Grundlage für diesbezügliche Experimente und Untersuchungen war mit der Entwicklung einer relativ einfachen Methode zur Kultur peripherer Lymphozyten durch MOORHEAD und Mitarbeiter (1960) (50) geschaffen. Hiervon abgeleitete Mikroverfahren (z.B. ARAKAKI und SPARKES, 1) sind heute für die Chromosomenanalyse die

Methode der Wahl, da sie es ermöglichen, aus wenigen Tropfen Blut hunderte von Mitosen zu untersuchen. Voraussetzung für eine sinnvolle "biologische Dosimetrie" nach Strahlenexposition von Personen ist zunächst eine genaue Kenntnis der Dosis-Wirkungs-Beziehung für Chromosomenaberrationen bei definierten Bestrahlungsbedingungen in vitro. Auf der Grundlage daraus resultierender Dosis-Wirkungs-Kurven soll dann eine Abschätzung der Strahlenbelastung in vivo durchgeführt werden. Vielfach beschränkt man sich dabei auf die Erfassung von dicentrischen Chromosomen, da diese leicht zu erkennen sind und zudem in unbestrahlten Kontrollen kaum vorkommen (ca. 1 dicentrisches Chromosom auf 2 000 Zellen).

Bei einer Strahlenexposition im niederen Dosisbereich (< 50 rad) ist die Häufigkeit dicentrischer Chromosomen gering und eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollen nur schwierig nachzuweisen. Für eine möglichst exakte "biologische Dosimetrie" wäre daher hier eine Dosisabschätzung unter Einbeziehung des gesamten Chromosomenschadens zu empfehlen.

Mit Hilfe konventioneller Färbetechniken können aber bestimmte Aberrationstypen entweder gar nicht erfaßt (z.B. pericentrische Inversionen, viele symmetrische Translokationen) oder nur unzureichend klassifiziert werden (z.B. acentrische Fragmente als Folge eines Bruchstückverlustes bzw. eines Strukturumbaus). Hier setzte man vor allem die Hoffnung auf eine differentielle Bandenfärbung der Chromosomen, die es ermöglichen könnte, Chromosomenschäden mit größerer Genauigkeit als mit konventionellen Färbetechniken zu erfassen und zu interpretieren und damit auch zu einer exakteren "biologischen Dosimetrie" zu kommen.

Darüber hinaus könnten Analysen der inter- und intra-chromosomalen Verteilung von Bruchstellen einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Primärereignisse bei der Aberrationsentstehung liefern. Bei der Verwendung konventioneller Färbung erhält man einheitlich dunkel gefärbte Chromosomen, die ausschließlich auf Grund morphologischer Kriterien nummeriert werden. Es sind dies vor allem die Gesamtlänge des Chromosoms, der Centromerindex und der Armindex, - Merkmale, die im Denver Schema (22) für die Benennung mitotischer Chromosomen benutzt wurden. Eine zusätzliche Hilfe bieten einige prominente Sekundäreinschnürungen, z.B. bei den Chromosomen Nr. 1, 9 und 16. Diese Charakteristika gestatten jedoch noch keine exakte Klassifizierung aller Chromosomen. Besonders die relativ ähnlichen Formen der C-Gruppe sind damit nicht individuell anzusprechen.

Der Begriff "Bandenmuster" für eine differentielle Anfärbung der Chromosomen wurde erstmals von CASPERSSON (Colorado Springs Meeting, 1970) verwendet. Für die Benennung der Bandenmuster hat die Pariser Konferenz 1971 (54) eine Standard-Nomenklatur erarbeitet, die in der vorliegenden Arbeit als Orientierungsgrundlage der gewählten G-Bandentechnik dient.

Hier wurde zunächst versucht, eine reproduzierbare G-Bandentechnik zu finden, die dann zur Untersuchung von röntgenstrahlen-induzierten Chromosomenaberrationen benutzt werden konnte. Die Notwendigkeit einer Prüfung der in der Literatur angegebenen Techniken ergab sich, weil die veröffentlichten Methoden im allgemeinen nur ungenügend reproduzierbar waren.

Die Arbeit ist daher in einen methodischen Teil, der die Technik der Bandenfärbung behandelt und einen experimentellen Teil, der sich mit der Analyse strahleninduzierter Chromosomenaberrationen befaßt, gegliedert.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Material

Für die Bestrahlungsversuche wurde Vollblut einer gesunden, unbestrahlten, weiblichen Person verwendet. Die Blutentnahme erfolgte steril unter Zusatz von Heparin (600 E/ml; 0,5 ml Heparin auf 10 ml Vollblut) aus der Armvene, unmittelbar vor dem jeweiligen Bestrahlungsversuch. In den unbestrahlten Kontrollkulturen ergab sich ein mittlerer, stathmo-kinetischer Mitoseindex von $21,7\% \pm 7,6$.

Blutspenden von Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Instituts ermöglichten die Experimente zur Erarbeitung einer Bandenfärbung. Allen Spendern sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

2.2. Methode

2.2.1. Bestrahlungsbedingungen

Jeweils 1 ml Vollblut wurde in eine verschraubbare Nylonkammer, deren obere und untere Begrenzung eine Hostaphan Folie (Stärke: 10μ) bildet, eingefüllt und in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Um diese Temperatur auch während der Bestrahlungszeit zu erhalten, wurde ein dichtes Plexiglasgehäuse, das mit einer Wärmequelle und einem elektronischen Temperaturregler ausgestattet war, verwendet. Die Dosismessung erfolgte mit einem Siemens-Universaldosimeter, dessen Ionisationskammer in derselben Position wie die Blutproben angebracht war.

Die Blutproben wurden einer Röntgenstrahlung von 220 kV (Filterung: 1 mm Cu, 13-14 mA) bei einer Dosis-

leistung von 50 R pro Minute in einem Focusabstand von 35 cm exponiert. Es wurden nacheinander die Dosen 40, 80, 120, 160, 200, 240 und 280 rad in verschiedenen Versuchen appliziert.

2.2.2. Blutkultur

Die Blutkultur wurde nach einer abgewandelten Mikromethode von ARAKAKI und SPARKES (1), modifiziert nach BAUCHINGER (6) durchgeführt:

100 ml Zell-Kulturmedium F 10 wurden mit 0,5 ml Streptomycin und 0,5 ml Penicillin gemischt. Von dieser Lösung wurden jeweils 4 ml je Blutkultur entnommen, mit 0,5 ml fötalem Kälberserum und 0,12 ml Phytohämagglutinin M (PHA) versetzt und 0,5 ml Vollblut dazugegeben.

Die Kulturzeit betrug 48 Stunden. Drei Stunden vor Abbruch der Kultur wurde dem Medium zur Anreicherung der Metaphasen Colcemid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt.

Unbestrahltes Blut wurde auf dieselbe Weise kultiviert und diente als Ausgangsmaterial für die Experimente zur Methode der Bandenfärbung (Siehe: 3.1.).

2.2.3. Chromosomenpräparation

Die Lymphozyten wurden durch Zentrifugieren (5 Minuten, 1000 Umdrehungen/Minute) gesammelt, für 5 Minuten einer hypotonischen Lösung (5 ml einer 0,075 M KCL-Lösung, pH: 6,1 - 6,3) bei 36°-37° C ausgesetzt, anschließend nochmals 5 Minuten bei 500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Fixierung (30 Minuten) erfolgte in einer Methanol-Eisessig-Mischung (3:1), die in dieser Zeit dreimal erneuert wurde. Durch Auftropfen der Zellsuspension auf in Aqua bidest. gekühlten Objektträgern

wurden die Chromosomen gespreitet. Nach Trocknung der Objektträger auf einer Wärmeplatte bei 38° - 40° C erfolgte die Färbung.

2.2.4. Bandenfärbung

Für jede Färbung wurden zwei Farblösungen frisch hergestellt:

- a) Giemsa-Lösung: 1 ml Giemsa-Stammlösung (Merck)
+ 49,2 ml Na_2HPO_4 -Lösung (1/15 M)
+ 50,8 ml KH_2PO_4 -Lösung (1/15 M)
- b) Leishman-Lösung: 20 ml Leishmanlösung;
(120 mg Leishmansubstanz (Merck)
in 100 ml Methanol (reinst) bei
 40° C gelöst), erwärmt auf 40° C,
+ 39,5 ml Na_2HPO_4 -Lösung (1/15 M)
+ 40,5 ml KH_2PO_4 -Lösung (1/15 M)

In jeder Lösung wurde zunächst ein Testobjektträger gefärbt. Die Färbezeit betrug in Lösung:

- a) 10 - 15 Minuten,
- b) 20 - 35 Minuten.

Zeigten die noch feuchten, nur kurz in Aqua bidest. abgespülten Präparate zu schwach gefärbte Chromosomen, wurde die Färbezeit verlängert, bzw., im gegenteiligen Fall verkürzt.

Nach der jeweils ermittelten, optimalen Färbezeit wurden die Präparate einzeln aus der Lösung genommen, schnell unter fließendem lauwarmen Leitungswasser abgespült und zur Vermeidung von Kalkflecken kurz in Aqua bidest. getaucht.

Nach dem Trocknen auf einer 40° C warmen Platte erfolgte das Eindecken mit Eukitt.

2.2.5. Mikroskopische Technik

Alle Versuche wurden mit Hilfe eines Photomikroskops (Zeiss) bei 1250-facher Vergrößerung ausgewertet. Sämtliche Metaphasen, die Chromosomenaberrationen aufwiesen, wurden fotografiert (Film: Kodak Panatomic-X, FX 135-36, 16 DIN).

Bei normaler bis schwacher Farbintensität, was nahezu ausnahmslos für die in Leishmanlösung gefärbten Präparate zutraf, war die Verwendung eines Phasenkontrastobjektivs günstiger, während die häufig stärker gefärbten Giemsa-Präparate durch ein Durchlicht-Objektiv fotografiert wurden. Bei allen Aufnahmen wurde ein grünes Interferenz-Breitband-Filter ($\lambda_{\text{max.}} = 546 \pm 5 \text{ nm}$) verwendet.

2.2.6. Auswertung

Die zur Auswertung verwendeten Zellen mußten 46 Centromere aufweisen.

Die Analyse der Aberrationen erfolgte nur an Hand der Photographien. Dabei mußte die Spreitung der Metaphase und die Qualität der Bandenfärbung so optimal sein, daß jedes Chromosom individuell anzusprechen war. Waren diese Voraussetzungen erfüllt, wurden die Chromosomen ausgeschnitten und Karyogramme erstellt. Die Beschreibung der Defekte erfolgte mit Hilfe der Nomenklatur für Chromosomenaberrationen, die auf der Pariser Konferenz 1971 (54) festgelegt wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1. Methodik

An rund 1200 Objektträgern wurden 495 Varianten zu verschiedenen, in der Literatur angegebenen Bandenfärbungen erprobt. In Tabelle 1 sind die Versuche dazu kurz aufgeführt. Die Gliederung der zu variierenden Schritte ist nach Schwerpunkten gesetzt.

3.1.1. Chromosomenpräparation

Alle Präparate, bis einschließlich Versuch Nr.97, wurden nach einer Routinemethode hergestellt (siehe: 2.2.3.). Ab Nr.280 wurde für die hypotonische Behandlung statt verdünnter Hank'scher Lösung 0,075 M KCl-Lösung verwendet. Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, daß die Verwendung von verdünnter Hank'scher Lösung für eine nachfolgende Bandenfärbung nicht geeignet war. Aus diesem Grund entfällt auch der bei der Routinemethode übliche Waschvorgang mit Hank'scher Lösung.

Das schnelle Trocknen der Objektträger nach dem Auftropfen der Zellsuspension durch die Flamme eines Bunsenbrenners war für eine Bandenfärbung ebenfalls ungünstig. Die Präparate wurden deshalb auf einer 40° C warmen Platte langsam getrocknet.

Tabelle 1:

Versuche zur Bandenfärbung

(+): Erklärung siehe 4.2.1.

Versuch/ Nummer	Bearbeiteter Teilschritt:	Variationen:
1- 36	Makrokulturen	Methode nach MIKKELSEN (49)
37- 55	Mikrokulturen Temperatur der Objektträger vor dem Einbringen in die Salzlösung	4°-80° C
56- 84	ASG-Technik (+), Zeit der SSC-Behandlung	1-24 Stunden
85-100	Trypsineinwirkung	Verschiedenen Zeiten und Konzentrationen
101-169	Trocknen nach dem Auftropfen	Gasflamme, warme und kalte Luft, Trockenschrank, abs. Methanol, Exsikkator
170-204	Zusammensetzung der Farblösung, Zeit der Färbung	Verschiedene Puffer, 2 Minuten - 1 Stunde
205-232	Einwirkung von NaOH vor der Salzlösung	Verschiedene Zeiten und Konzentrationen
233-279	Verschiedene Salzlösungen	Mc Ilvaine-Soerensen-Puffer, Puffertabletten, Phosphat-Puffer, 2x-, 4x-, 12 x-SSC
280-357	Hypotonische Lösungen	Hank's, Aqua bidest. 1:4 NaCl, Na-Citrat
358-385	KCL als hypotonische Lösung	Verschiedene Konzentrationen
386-495	Temperaturen der Farblösung, Zeit der Färbung, Aufbewahrung ungefärbter Präparate	32°, 37°, 40° C 5-30 Minuten Tiefkühltruhe, Eisschrank Exsikkator

3.1.2. Bandenfärbung

Es zeigte sich, daß die Vorbehandlung der Präparate mit Salzlösungen verschiedener Zusammensetzung für die Entstehung von Bandenmustern nicht obligatorisch ist. Deshalb wurden ab Versuch Nr. 346 alle vorbehandelnden Schritte weggelassen.

Als ausschlaggebende Faktoren der Bandenfärbung erwiesen sich die Konzentration, die Zusammensetzung und die Temperatur der Farblösung.

Leishman-Eosin-Methylenblau-Lösung mußte gesättigt sein und, im Gegensatz zur Giemsa-Lösung, konzentriert angewandt werden (20 ml Leishman-Stammlösung : 80 ml Puffer). Mit der Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung) gelangen die Färbungen besser, wenn die Lösung stark verdünnt angewandt wurde (1 ml Giemsa-Stammlösung : 100 ml Puffer). Zum Verdünnen der Farblösungen bewährten sich die unter 2.2.4. angegebenen Puffermischungen.

Für G-Banden war ein pH-Bereich von 6,7 - 6,9 am besten geeignet.

Eine Erwärmung der Leishman-Stammlösung auf 40° C unmittelbar vor der Färbung hatte eine Verbesserung der Ergebnisse zur Folge. Eine höhere Temperatur der Giemsa-Farblösung (Giemsa-Stammlösung 1 ml + Puffer 100 ml) bis zu 40° C beeinflusste dagegen die Bandenfärbung nicht.

Das Alter der Farb-Stammlösungen war von untergeordneter Bedeutung, nicht jedoch das Alter der Präparate. Wenn die Zellsuspension einmal aufgetropft und getrocknet war, mußten die Präparate sofort gefärbt werden. Allerdings konnte die Zellsuspension, ohne Beeinträchtigung einer anschließenden Bandenfärbung, 1-2 Tage im Eisschrank aufbewahrt werden. Der gesamte Färbeansatz (Farb-Stammlösung + Puffer) war nur am Tag der Herstellung zu verwenden.

3.1.5. Charakteristisches Bandenmuster

Unter diesem Begriff ist das überwiegend auftretende Bandenmuster der Chromosomen bei Anwendung der unter 2.2.4. beschriebenen Methode zu verstehen. Das charakteristische Bandenmuster ist in Abbildung 1 auf der Grundlage von 50 Karyogrammen als Schema dargestellt. Die einzelnen Chromosomen dieser 50 Karyogramme wurden jeweils mit dem entsprechenden Chromosom der schematischen Bandenmusterdarstellung der Pariser Konferenz verglichen. Hierbei ist zu beachten, daß das "Pariser Schema" im Vergleich zu dem hier abgebildeten, auf der Grundlage von Q-, R- und G-Banden erstellt wurde.

Das charakteristische Bandenmuster ergibt sich aus den Banden, die auf einem Chromosom am häufigsten auftreten. Als typische Banden eines bestimmten Chromosoms werden solche bezeichnet, die in mindestens 75% der ausgewählten Karyogramme vorkommen. Zum Vergleich zeigt Abbildung 2 neben einem Diagramm eines Chromosoms nach dem "Pariser Schema" jeweils drei Chromosomen nach G-Bandenfärbung.

Die Chromosomen Nr. 1, 6 und 10 haben jeweils eine Bande, die in allen 50 Karyogrammen (= 100%) zu finden war. Da Nr. 1 allein nach morphologischen Kriterien - er ist das längste, mediane Chromosom im Chromosomensatz - leicht erkennbar ist, die Nr. 6, 10, 11 und 12 der C-Gruppe aber schwieriger einzuordnen sind, richtete sich die Beurteilung einer Mitose nach der Erkennbarkeit der typischen Banden.

Die Chromosomen Nr. 2 und 3, ebenfalls auf Grund ihrer Morphologie unterscheidbar, zeigen aber auch typische (2 p12, p 14-6 und q 22-4), beziehungsweise charakteristische Banden (3 p11-4, q 11-3, u.a.).

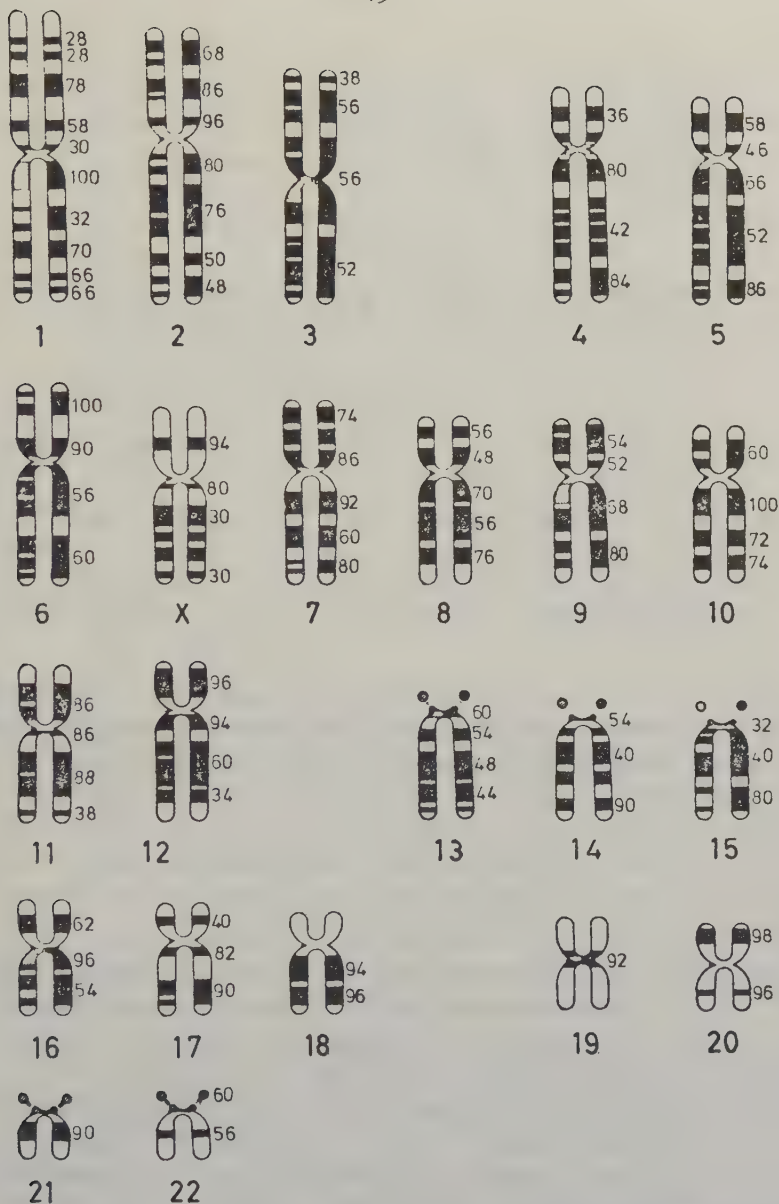


Abbildung 1: "Charakteristisches" Bandenmuster auf der Grundlage von 50 analysierten Karyogrammen. Die linke Chromosomenhälfte zeigt das Schema der Pariser Konferenz (1971). Die Zahlen entsprechen der prozentualen Häufigkeit des Auftretens der Banden (50 Karyogramme = 100 %). Typische Banden bei $\geq 75\%$, Werte $< 25\%$ sind nicht angegeben.

 Variable Banden.

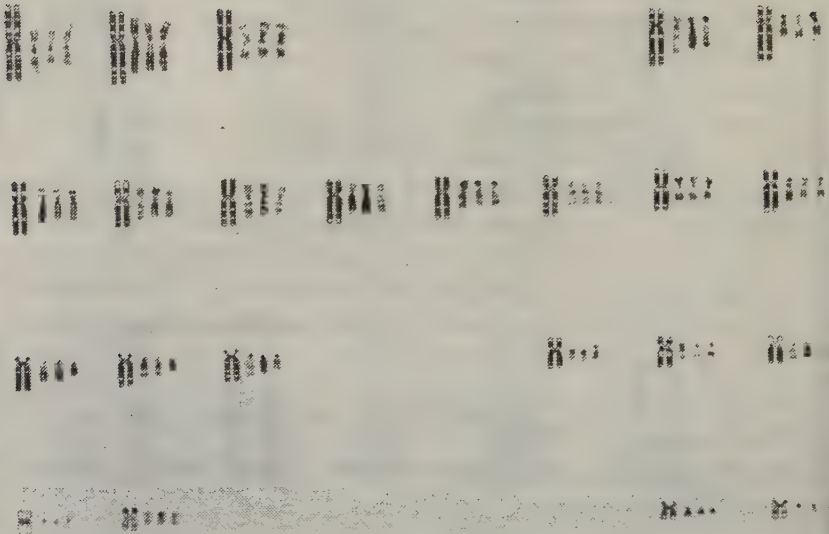


Abbildung 2: Vergleich der Bandenmuster von jeweils drei Chromosomen nach G-Bandenfärbung mit dem "Pariser Schema".

Vor allem bei Chromosom Nr. 3 stellen die negativen Banden im kurzen (p21) und langen (q21) Arm ein sicheres Erkennungsmerkmal dar.

Die Unterscheidung innerhalb der B-Gruppe wird dadurch möglich, daß Nr. 5 im terminalen Bereich des langen Armes meistens eine deutlich breitere, negative Bande (5 q31) als Nr. 4 (4 q31) hat. Chromosom Nr. 5 weist häufig eine positive Bande im kurzen Arm auf (5 p12), die nicht im "Pariser Schema", aber im charakteristischen Bandenmuster von Abbildung 1 eine Entsprechung auf Nr. 4 hat.

In der C-Gruppe können, wenn erst einmal die Chromosomen Nr. 6, 10, 11 und 12 (siehe oben) sicher festgelegt sind, Chromosom Nr. 7 an den drei deutlichen, positiven Banden des langen Armes und den beiden positiven Banden im kurzen Arm, das X-Chromosom an der von breiten Euchromatinregionen umgebenen Bande p21 eindeutig erkannt werden. Die Chromosomen Nr. 8 und 9 sind sich nicht nur morphologisch, sondern auch in ihren Bandenmustern sehr ähnlich. Auch in diesem Fall ermöglicht aber eine negative Bande (9 q22) die Klassifizierung der beiden Chromosomen.

Die Chromosomen der Gruppen D, E, F und G können ohne Schwierigkeiten eingeordnet werden.

Die Konzentrierung positiver Banden im terminalen Bereich des langen Arms ist charakteristisch für das Chromosom Nr. 13, während Nr. 14 durch eine typische positive (q31) und eine breite negative Bande (q24) ausgezeichnet ist.

Aus Abbildung 1 und 2 ist ersichtlich, daß die Chromosomen der E-Gruppe völlig verschieden lokalisierte Banden zeigen, die in jedem der drei Chromosomen einmal (Nr. 16q11) oder sogar zweimal (Nr. 17 q12, q22-4, Nr. 18 q12, q22) als typische Banden in über 80 % der Karyogramme auftreten.

Die beiden gleichgroßen, medianen Chromosomen Nr. 19 und Nr. 20 der F-Gruppe haben ebenfalls ein sehr unterschiedliches, leicht erkennbares Bandenmuster und können daher sicher differenziert werden.

Das trifft auch für die Chromosomen Nr. 21 und Nr. 22 der G-Gruppe zu. Nr. 21 hat im Gegensatz zu Nr. 22 eine starke positive Bande (q21) im langen Arm.

Die praktische Anwendung einer differentiellen Bandenfärbung bei der Aufstellung eines Karyogrammes wird in Abbildung 3 veranschaulicht. Ein Vergleich der beiden Karyogramme, die von ein und derselben Zelle nach konventioneller und nach G-Banden-Färbung stammen, zeigt die eindeutigen Vorzüge der G-Banden-Färbung.

3.2. Bestrahlungsversuche

Zum Vergleich der Auswertungskriterien wurden nach Bestrahlung 830 Zellen mit Bandenmuster und ebenso viele ohne Bandenmuster auf ihre Chromosomendefekte hin untersucht. 200 unbestrahlte Zellen dienten zur Kontrolle.

3.2.1. Aberrationstypen

Bei der Chromosomenanalyse wurden alle erkennbaren Defekte gezählt. Die mit Bandenfärbung erhobenen Befunde zeigt Tabelle 2, jene mit konventioneller Färbung Tabelle 3.

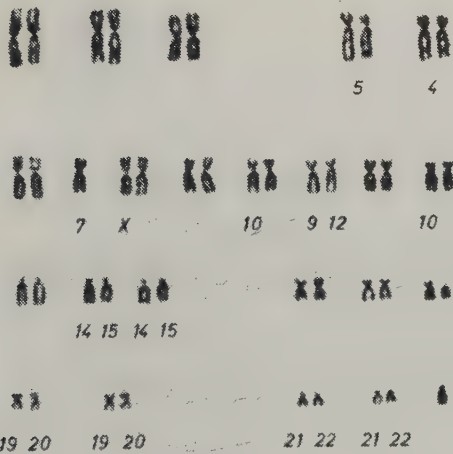
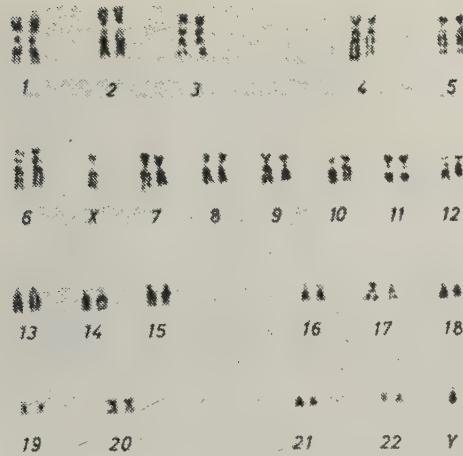


Abbildung 3: Karyotyp einer männlichen Zelle nach G-Bandenfärbung. Darunter Karyogramm derselben Zelle nach konventioneller Färbetechnik (Orcein-Eisessig), erstellt nach den Kriterien der Chromosomenlänge und Lage des Centromers. Die hierbei falsch positionierten Chromosomen sind gekennzeichnet.

Dosis in rad	0	40	80	120	160	200	240	280
Gesamtzahl aus- gewerteter Zellen	200	146	117	121	108	105	160	75
N-Zellen (%)	100,0	95,9	92,3	86,0	82,4	71,8	45,6	49,3
S-Zellen (%)	-	4,1	7,7	14,0	26,9	28,2	54,4	48,7
Aberrationen pro Zelle:								
Chromatidbrüche	-	0,007	0,009	0,008	0,019	0,039	0,050	0,027
Acentrische Fragmente	-	0,014	0,042	0,042	0,120	0,185	0,413	0,533
Minutes	-	-	-	0,025	0,028	0,029	0,056	0,013
Ringchromosomen	-	0,007	0,009	0,008	-	-	0,044	0,080
Acentrische Ringe	-	-	0,009	0,008	0,028	0,019	0,019	0,013
Dicentrische Chromosomen	-	0,021	0,034	0,083	0,222	0,301	0,625	0,693
Translokationen	-	-	0,009	0,025	0,019	0,049	0,263	0,147
Inversionen	-	-	-	-	-	-	0,006	0,006
Chromatidaustausch	-	-	-	-	-	-	-	0,013
Gesamtbruch- ergebnisse	-	0,058	0,179	0,347	0,731	0,954	2,488	2,533

Tabelle 2: Mittlere Häufigkeit verschiedener Zell- und Aberrationstypen nach Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen bei Bandenfärbung.

N-Zellen - Zellen mit normaler Chromosomenmuster

Dosis in rad	0	40	80	120	160	200	240	280
Gesamtzahl aus- gewerteter Zellen	200	146	117	121	108	103	160	75
N-Zellen (%)	100,0	96,6	84,5	74,4	65,7	47,6	37,5	25,3
S-Zellen (%)	-	3,4	15,4	25,6	34,3	52,4	62,5	74,1
Aberrationen pro Zelle:								
Chromatidbrüche	-	-	-	0,017	-	-	0,030	-
Acentrische Fragmente (ac ₁)	-	0,014	0,089	0,141	0,167	0,204	0,331	0,493
Acentrische Fragmente (ac ₂)	-	0,014	0,089	0,124	0,139	0,117	0,219	0,267
Minutes	-	0,017	0,017	0,009	0,029	0,050	0,080	-
Ringchromosomen	-	-	0,009	-	0,037	0,019	0,025	-
Acentrische Ringe	-	-	-	-	-	0,010	-	-
Dicentrische Chromosomen	-	0,027	0,034	0,107	0,185	0,447	0,550	0,720
Atypische Chromosomen	-	-	0,009	-	0,009	0,019	0,019	-
Chromatidaustausch	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamtbruch- ereignisse (ac ₁)	-	0,059	0,222	0,405	0,648	1,243	1,550	2,147
Gesamtbruch- ereignisse (ac ₂)	-	0,069	0,222	0,388	0,620	1,165	1,538	1,920

Tabelle 3:

Mittlere Häufigkeit verschiedener Zell- und Aberrationstypen nach Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen bei konventioneller Färbung.

Die Einteilung der Zell- und Aberrationstypen folgt einer Klassifizierung von BAUCHINGER (6).

Die Analyse von acentrischen Fragmenten ist nach konventionellen Färbetechniken, im Vergleich zu einer Bandenfärbung, schwierig, weil insbesondere in Zellen mit mehreren Fragmenten und Austauschaberrationen nicht immer eindeutig entschieden werden kann, wieviele Fragmente zum Austausch gehören. Zu einer vergleichenden Analyse der acentrischen Fragmente wurde daher bei konventioneller Färbung eine von SCHMID et al. (62) vorgeschlagene Bewertung in ac_2 und ac_1 vorgenommen. Dabei wird die Zahl der ac nach verschiedenen Gesichtspunkten bestimmt: Kamen in einer Zelle mehrere, nicht identische, acentrische Fragmente neben Austauschaberrationen (dicentrische Chromosomen, Ringchromosomen, atypische Chromosomen) vor, so wurden entweder zwei Fragmente (unter der Annahme, daß inkomplette Austauschprozesse vorliegen) oder jeweils nur ein Fragment (komplette Austauschprozesse) einer Austauschaberration zugeordnet, während die verbleibenden als zusätzliche Fragmente gezählt wurden. Die daraus resultierenden Gruppen werden mit ac_2 bzw. mit ac_1 bezeichnet.

Insgesamt wurden nur 4 tricentrische Chromosomen beobachtet. Ein tricentrisches Chromosom wurde bei der Bewertung jeweils als 2 dicentrische Chromosomen gezählt.

Nach Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen wurden mit Hilfe der G-Bandenfärbung (2.2.4.) in 830 Zellen insgesamt 501 Aberrationsfiguren analysiert.

Eine schematische Darstellung verschiedener Aberrationstypen und ihre Häufigkeit ist abgesehen von 19 Chromatidbrüchen und einem Chromatidaustausch (Abbildung 5) in Abbildung 4 gegeben. Typische Beispiele für die Bandenanalyse des strahleninduzierten Chromosomenschadens zeigen die Karyotypen der Abbildungen 5 - 12.

Bereits an anderer Stelle wurde darauf hingewiesen, daß bestimmte Aberrationstypen mit konventionellen Färbetechniken entweder gar nicht erfasst oder nur unzureichend klassifiziert werden können. Von den kompletten Intrachange-Aberrationen können pericentrische Inversionen, bei etwa gleicher Entfernung der Bruchstellen vom Centromer nur durch eine Bandenanalyse entdeckt werden. Wegen der Kleinheit der 'minute'-Fragmente ist eine Zuordnung zu ihren Ursprungschromosomen jedoch auch mit einer Bandenfärbung in der Regel nicht möglich. Deletionen oder acentrische Ringe werden bei konventioneller Färbung zwar als Aberrationen erkannt, eine sichere Positionierung der Bruchstellen gelingt aber nur in wenigen Fällen. Hier, wie bei der Zuordnung von acentrischen Fragmenten zu den entsprechenden Interchange Prozessen (Polycentrische Chromosomen, inkomplette symmetrische Translokationen; Abbildung 7), ist man auf die Bandenfärbung angewiesen.

Von 481 Aberrationstypen sind 197 (=41,0%) intrachromosomale, 284 (=59,0%) interchromosomale Defekte. 220 (=77,4%) Interchanges sind unsymmetrische, 64 (=22,6%) symmetrische Aberrationstypen. Sie treten überwiegend als komplette Formen (203=71,5%) auf. Dicentrische und tricentrische Chromosomen entstanden zu rund

90.0% bei kompletten Austauschprozessen, Translokationen im selben Ausmaß, jedoch bei inkompletten Vorgängen. Intrachanges liegen insbesondere auf Grund der hohen Zahl terminaler Deletionen (129) zu 88.0% (=173) als inkomplette Figuren vor.

Die Abbildung 11 und 12 sind Beispiele für die Vorzüge der Bandenfärbung gerade bei der Bewertung acentrischer Fragmente. So zeigt Abbildung 11 einen unsymmetrischen inkompletten Interchange-Vorgang, der in dieser Form nur einmal in 830 ausgewerteten Zellen beobachtet wurde. Im Karyotyp der Abbildung 12 sind 2 Fragmente neben einem dicentrischen Chromosomen vorhanden. Nur durch die Bandenanalyse kann eindeutig festgelegt werden, daß es sich hierbei nicht um einen inkompletten Interchange handelt (Abbildung 4), sondern um eine komplette Form. Das zweite Fragment ist durch partielle Endoreduplikation entstanden; beide Fragmente sind somit identisch.

JNTRACHANGE							
normal	komplett		inkomplett				
	1. Minute	Inversion pericentr.	Deletion			Ringchro- mosom	
	 19	 2	terminal	Inter- stitiell	term. oder interstit.	 16	
	2. acentr. Ring		 129	 4	 16		
	 3			2. acentr. Ring			 8
					22		

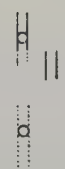
INTERCHANGE						
normal	unsymmetrisch				symmetrisch	
	komplett		inkomplett		komplett	inkomplett
	dic	tric	dic	tric	Transl.	Transl.
						
						
	196	1	20	3	6	58

Abbildung 4: Aberrationstypen.

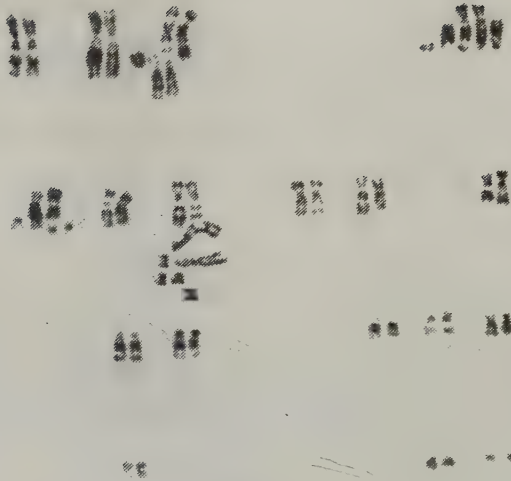


Abbildung 5: Karyotyp nach Röntgenbestrahlung
mit 280 rad.

46,XX, 1 Chromatidaustausch, 4 dic, 1 del.

Chromatidaustausch 7 q32 :: 4 q2,
dic (3;8)(3 pter→3 q23 :: 8 p21→8 pter),
dic (5;13)(5 pter→5 q13 :: 13 q3→13 pter),
dic (6;19)(6 pter→6 q21 :: 19 q13→19 pter),
dic (4;11)(11 qter→11 q1 :: 4 p1→4 qter),
del 5 q31: .

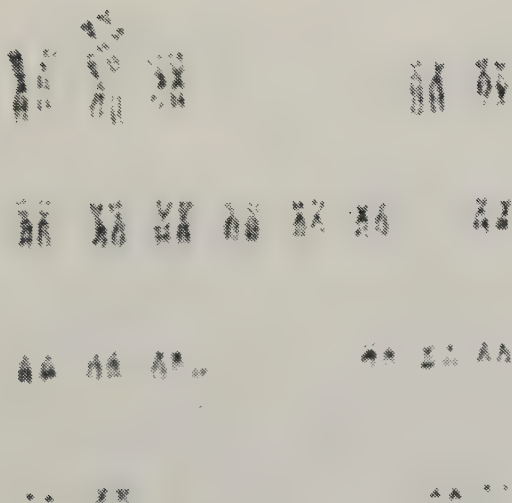


Abbildung 6: Karyotyp nach Röntgenbestrahlung
mit 240 rad.

46,XX, 1 inv, 1 dic, 1 del.

inv (1 qter → 1 q23 :: 1 p22 → 1 q23 :: 1 p22 → 1 qter),
dic (2;11)(2 qter → 2 p25 :: 11 q1 → 11 pter),
del 15 q23: .

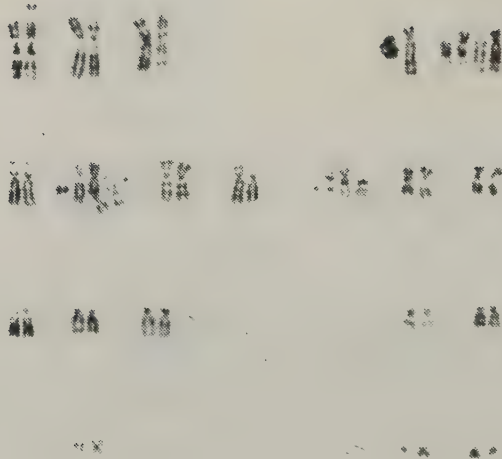


Abbildung 7: Karyotyp nach Röntgenbestrahlung
mit 280 rad.

46,XX, 1 trans, 1 R_c , 3 dic.

trans (1 p+/7 q-)(1 qter $\rightarrow$ 1 p32 :: 7 q2 $\rightarrow$ 7 qter),

R_c (4 p1 $\rightarrow$ 4 q3),

dic (5;16)(5 pter $\rightarrow$ 5 q11 :: 16 q21 $\rightarrow$ 16 pter),

dic (X;9)(X pter $\rightarrow$ X q21-3 :: 9 q13 $\rightarrow$ 9 pter)

(inkomplett),

dic (10;19)(10 pter $\rightarrow$ 10 q11 :: 19 q(p)13 $\rightarrow$ 19 p(q)ter)

(inkomplett).

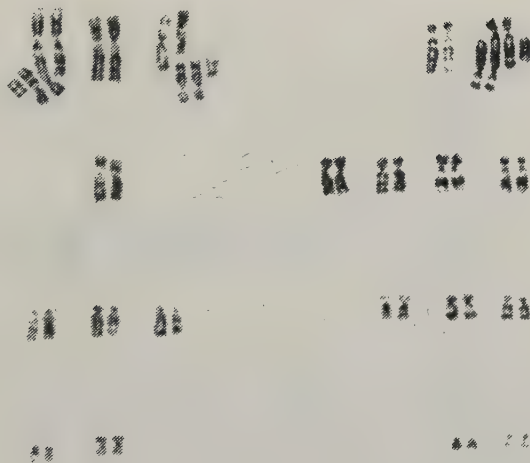


Abbildung 8: Karyotyp nach Röntgenbestrahlung
mit 240 rad.

46,XX, 3 dic.

dic (1;7)(1 pter→1 q44 :: 7 q11→7 pter),
dic (3;9)(3 pter→3 q27 :: 9 q13→9 pter)
(inkomplett),
dic (5;6)(5 pter→5 q35 :: 6 q12→6 pter).

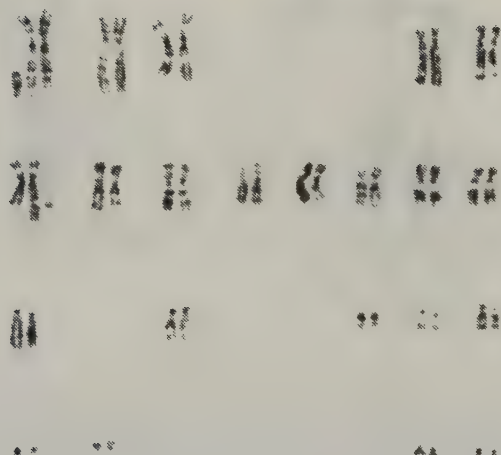


Abbildung 9: Karyotyp nach Röntgenbestrahlung
mit 240 rad.

46,XX, 1 trans, 1 dic, (1 gap).

trans (6 q+/1 q-)(6 pter→6 q23 :: 1 q25→1 qter)
(komplett),

dic (1;14)(1 pter→1 q25 :: 14 q31→14 pter).

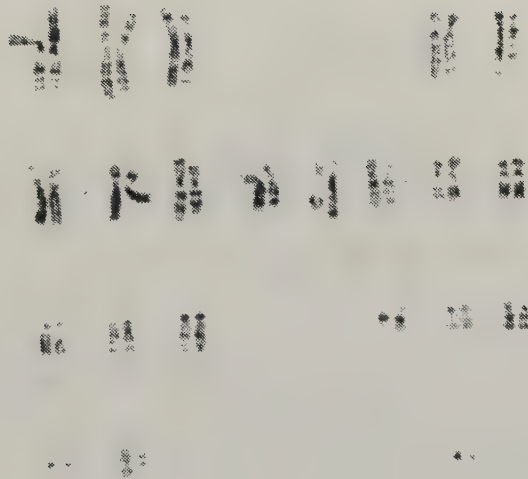


Abbildung 10: Karyotyp nach Röntgenbestrahlung
mit 240 rad.

46,XX, 2 trans, 1 del.

trans (3 q+/7 q-)(3 pter→3 q23 :: 7 q34→7 qter),
trans (5 q+/3 q-)(5 pter→5 q35 :: 3 q23→3 qter),
del 9 q1: .

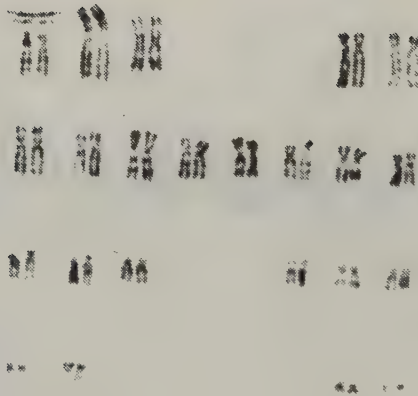


Abbildung 11: Karyotyp nach Röntgenbestrahlung
mit 200 rad.

46,XX, 1 asymmetrischer, unvollständiger Austausch,
1 del.

2 Bruchereignisse in 1 p13 :



del 2 p11.

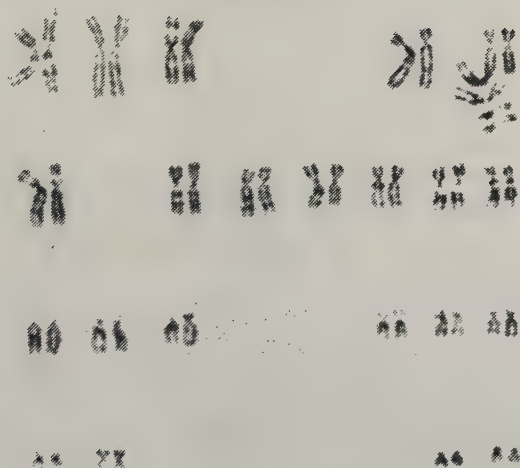


Abbildung 12: Karyotyp nach Röntgenbestrahlung
mit 200 rad.

46,XX, die mit 2 identischen ac.

dic (5;X)(5 pter→5 q35 :: X p11→X qter).

3.2.2. Dosis-Wirkungsbeziehungen

Die Analyse von Dosis-Wirkungsbeziehungen für die einzelnen Aberrationstypen ist von der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen abhängig. Bei kleinen Zahlen ergibt die statistische Behandlung eine zu grose Variabilität. Das trifft schon dann zu, wenn, wie es für die Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen üblich ist, 2000-3000 Zellen herangezogen werden.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit nur rund 800 Zellen ausgewertet wurden, soll, um Trends aufzeigen zu können, der Versuch gemacht werden eine Dosis-Wirkungsbeziehung darzustellen.

Eine Anpassung der grundlegenden Modelle der Dosis-Wirkungsbeziehung an die empirischen Daten gelang nur für eine Potenzfunktion: $Y = c + kD^n$ (62). Da c überall den Wert 0 erhält (c = Aberrationshäufigkeit in Kontrollen), ergab sich: $Y = k \cdot D^n$.

Y = Aberrationsausbeute

k = Koeffizient der Aberrationsinduktion

D = Bestrahlungsdosis in R

n = Dosisexponent

Die Dosis-Wirkungsbeziehung für dicentrische Chromosomen ist in Abbildung 14, für acentrische Fragmente in Abbildung 15 dargestellt. Die Befunde für diese beiden Aberrationstypen sind nach Bandenfärbung erhoben.

Die Regressionsanalyse wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt. Die Signifikanz der Anpassung der empirischen Daten an das vorgegebene Modell (Goodness-of-fit) wurde mit Hilfe des χ^2 -Tests geprüft.

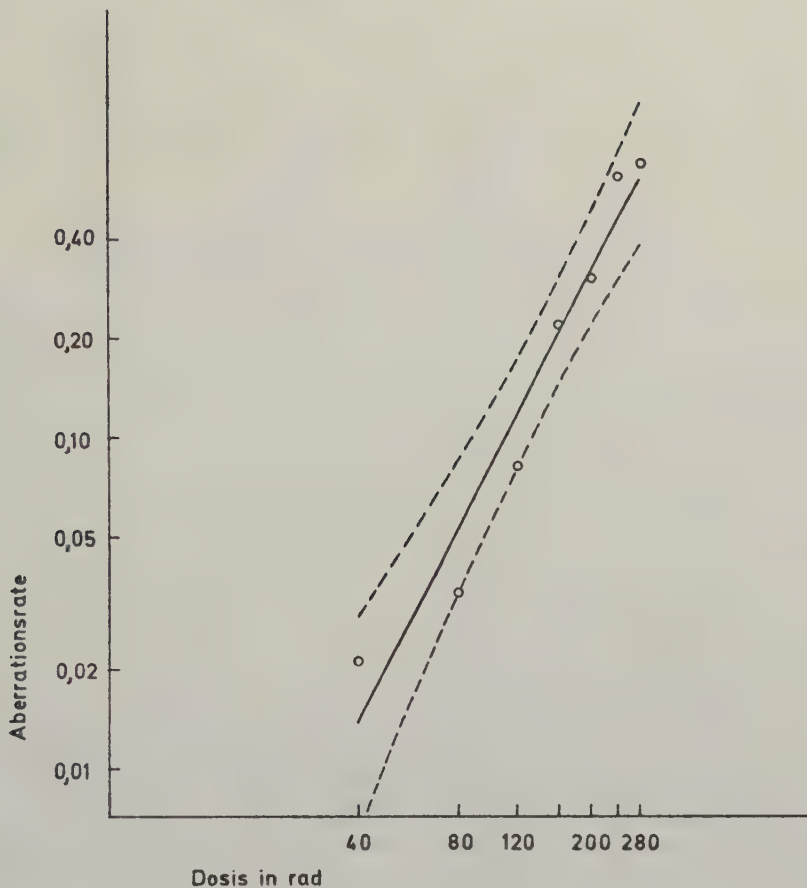


Abbildung 14: Dosis-Wirkungsbeziehung für dicen-
trische Chromosomen nach Bandenfärbung. Für die
Regressionslinie ist der 95 % Vertrauensbereich
dargestellt.

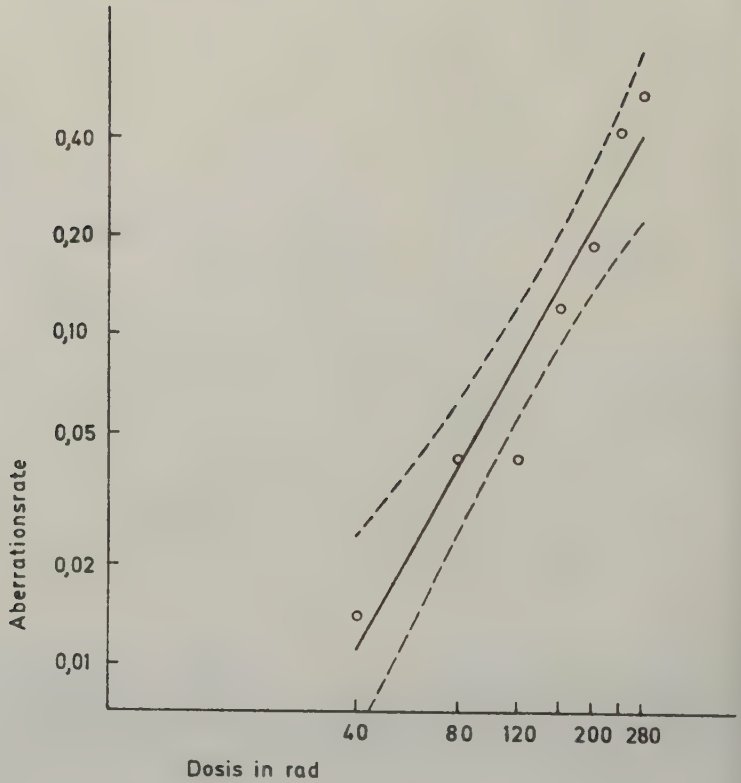


Abbildung 15: Dosis-Wirkungsbeziehung für acen-
trische Fragmente nach Bandenfärbung. Für die
Regressionslinie ist der 95 % Vertrauensbereich
dargestellt.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zeigt Tabelle 4. Zum Vergleich sind frühere Ergebnisse aus dieser Arbeitsgruppe nach konventioneller Färbung (62) angegeben. Die Dosis-Wirkungskurven basieren dort auf der Grundlage von 2500 ausgewerteten Zellen.

Einen Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen für die beiden Aberrationstypen (dicentrische Chromosomen und acentrische Fragmente) nach Bandenfärbung und konventioneller Färbung zeigt Tabelle 5. Dazu wurde ein Identitätstest von SCHNEEBERGER (63) benutzt und errechnet, ob sich die entsprechenden Funktionen auf dem Signifikanzniveau von $P=0,05$ unterscheiden.

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß hier die mit konventioneller Färbung und Bandenfärbung erhobenen Befunde für dicentrische Chromosomen zu identischen Dosis-Wirkungsbeziehungen führen. Ordnet man nach konventioneller Färbung die Befunde für acentrische Fragmente nach den in 3.2.1. erläuterten Kriterien in die beiden Gruppen ac_1 und ac_2 , und vergleicht sie mit den Befunden für acentrische Fragmente nach Bandenfärbung, so zeigen sich auch hier keine unterschiedlichen Dosis-Wirkungsbeziehungen.

Ein Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehung für dicentrische Chromosomen und acentrische Fragmente, wie sie in der oben zitierten Arbeit (62) angegeben sind, mit der vorliegenden Dosis-Wirkungsbeziehung nach Bandenfärbung, zeigt eine Übereinstimmung für dicentrische Chromosomen aber signifikante Unterschiede sowohl für ac_1 als auch für ac_2 .

k	n	Goodness-of-fit		Y = kD ⁿ
		χ^2	FG P	
(1,0 ± 0,6) • 10 ⁻⁵	1,95 ± 0,21	9,07	5 0,09	dic-B
(1,07 ± 0,73) • 10 ⁻⁵	1,87 ± 0,23	11,41	5 0,05	ac-B
(1,71 ± 0,62) • 10 ⁻⁵	1,87 ± 0,20	8,32	5 0,15	dic-K
(4,45 ± 1,07) • 10 ⁻⁵	1,63 ± 0,21	5,23	5 0,41	ac ₁ -K
(1,59 ± 0,59) • 10 ⁻⁴	1,33 ± 0,24	6,88	5 0,23	ac ₂ -K
(1,76 ± 0,93) • 10 ⁻⁴	1,86 ± 0,10	10,8	6 0,10	dic-K (62)
(12,7 ± 3,4) • 10 ⁻⁵	1,43 ± 0,05	2,6	6 0,85	ac ₁ -K (62)
(2,78 ± 0,6) • 10 ⁻⁴	1,20 ± 0,12	1,51	5 0,92	ac ₂ -K (62)

Tabelle 4:

Statistische Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung für dicentrische Chromosomen und acentrische Fragmente nach Röntgenbestrahlung bei Bandenfärbung (B) und konventioneller Färbung (K).

n ± Standardfehler; FG = Freiheitsgrad;

(62) frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe nach konventioneller Färbung.

Aberrationstyp	FG	F	P _{0.05}	
dic-B/ dic-K	2; 10	0,141	4,10	identisch
dic-B/ dic-K (62)	2; 11	3,080	3,98	identisch
ac-B/ ac ₁ -K	2; 10	1,325	4,10	identisch
ac-B/ ac ₂ -K	2; 10	1,290	4,10	identisch
ac-B/ ac ₁ -K (62)	2; 11	7,69	3,98	verschieden
ac-B/ ac ₂ -K (62)	2; 11	6,04	3,98	verschieden
ac ₁ -K/ ac ₁ -K (62)	2; 11	2,10	3,98	identisch
ac ₂ -K/ ac ₂ -K (62)	2; 11	0,38	3,98	identisch

Tabelle 5:

Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen für dicentrische Chromosomen und acentrische Fragmente nach Röntgenbestrahlung bei Bandenfärbung (B) und konventioneller Färbung (K).

FG = Freiheitsgrade;

(62) frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe nach konventioneller Färbung.

3.2.3. Bruchstellenverteilung

Das Verteilungsmuster der Bruchstellen auf den einzelnen Chromosomen wurde nach G-Bandenfärbung untersucht. Eine Zusammenstellung der Verteilung der Bruchereignisse in den Chromosomen und ihren Teilbereichen zeigt Tabelle 6 und Abbildung 16. In der Spalte "Anzahl der Bruchereignisse" sind unter "Bande" die Zahl der sicher lokalisierbaren, unter "Region" die Zahl der nur in Regionen festzulegenden Brüche aufgeführt. Die Zahl der Brüche innerhalb einer Region ergibt sich aus der Summe dieser beiden Spalten.

3.2.3.1. Brüche in den Chromosomen

Die ermittelten Brüche im Gesamtchromosom wurden zunächst zur relativen Länge (Werte nach Pariser Konferenz (1971) Serie D) des betreffenden Chromosoms in Beziehung gesetzt, um zu prüfen, ob eine längenproportionale Verteilung vorlag.

Die theoretischen Werte errechnen sich aus dem Produkt der relativen Länge des Einzelchromosoms und der Summe aller Bruchereignisse (=793), dividiert durch die Summe der relativen Länge des gesamten Chromosomensatzes (105,11). Tabelle 7 zeigt die statistische Berechnung für eine längenproportionale Verteilung. Aus der $\sum \chi^2 = 72.56$ ergibt sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0.001$, daß die Brüche interchromosomal nicht zufällig verteilt sind.

Eine Abschätzung für die Wahrscheinlichkeit (P), daß die beobachtete Bruchzahl auftritt, falls die erwartete Bruchzahl richtig ist, erhält man durch die Tschebyscheffsche Ungleichung. Ist diese Wahrscheinlichkeit klein ($P \leq 0,1$), so hat man es also mit einem unwahrscheinlichen Ereignis zu tun (29).

Umgekehrt steigt damit die Wahrscheinlichkeit, daß (wenn die beobachtete Bruchzahl sich um ein Vielfaches k der Streuung σ vom theoretischen Mittelwert ($\bar{X}$) unterscheidet), die erwartete Bruchzahl näher an der beobachteten liegt.

Die Berechnungen wurden für jedes Chromosom nach folgenden Formeln durchgeführt.

Theoretische Streuung:

$$\sigma = \sqrt{\bar{X} \cdot \left(1 - \frac{\text{Relative Länge des Chromosoms}}{105,11}\right)}$$

$$k = \frac{B - \bar{X}}{\sigma}$$

$$P = \frac{1}{k^2}$$

Nimmt P Werte $< 0,05$ an, so ist die Wahrscheinlichkeit, daß der theoretische Mittelwert ($\bar{X}$) mit dem beobachteten Wert (B) übereinstimmt, klein. Das heißt, im Mittel sind mehr Bruchereignisse zu erwarten, als $\bar{X}$ angibt. Dieser Fall trifft für das Chromosom Nr. 1 ($P=0,034$) und Nr. 5 ($P=0,005$) zu. Bei allen anderen Chromosomen sind die Abweichungen von beobachtetem und theoretischem Wert durch statistische Schwankungen erklärbar.

Tabelle 6: Verteilungsmuster strahleninduzierter Bruchereignisse in den verschiedenen Chromosomen.
Die Klammern kennzeichnen die positiven G-Banden

Bezeichnungen nach Pariser Konferenz				Anzahl der Bruchereignisse											
Chrom.-Nummer	Arm	Region	Bande	Bande	Region	Region Summe	Arm	Total							
1	p	3	6 (5) 4 (3) 2 (1)	10 - 2 - 18 3	3	36	61	105							
			2 (1)	10 1					-	11					
			3 (2)	13 -					2	14					
			1 (2)	1 3					2	6					
			2 (2) 3 (4)	9 - 4 -					-	15					
	q	3	5 (1) 2 (1) 2 (3) 4	2 1 9 - 7 -	2	12	44								
			2 (1) 2 (3) 4	7 - 2					2	11					
			2	2					5 (4) 3 (2) 1 (6) 5 (4) 3 (2) 1	1 - - - 6 - 1 - 2 -	2	9	14		
									1 (6) 5 (4) 3 (2) 1	6 - 1 - 2 -				-	5
									1 (2) 3 (4)	1 1 2 -				-	4
	2 (2) 3 (4)	5 - -			4	9									
3 (2) 3 (4) 5 (6) 7	8 - 1 - 4 -	5			20										

Tabelle 6: Fortsetzung

Bezeichnungen nach Pariser Konferenz				Anzahl der Bruchereignisse					
Chrom. Nummer	Arm	Region	Bande	Bande	Region	Region Summe	Arm	Total	
3	p	2	7 (6) 5 (4) 3 (2) 1	1 1 3 - - 12	2	19	23	57	
			(4) 3 (2) 1	1 2 - -					
			1 2 (3) 1	- 1 - -					
			(1) 2 (3) 1	- 1 - -					
			1 2 (3) 1	1 1 - -					
	q	2	(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	- 3 - 4 3 5 - 1	6	33	34		
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	- 3 - 4 3 5 - 1					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	- 3 - 4 3 5 - 1					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	- 3 - 4 3 5 - 1					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	- 3 - 4 3 5 - 1					
4	p	1	6 (5) 4 (3) 2 1	6 1 3 - 1 1	2	14	14	39	
			1 2 (3) 1	- 2 - -					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	3 - - 1 - 1 -					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	3 - - 1 - 1 -					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	3 - - 1 - 1 -					
	q	2	1 2 (3) 1	- 2 - -	4	9	25		
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	3 - - 1 - 1 -					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	3 - - 1 - 1 -					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	3 - - 1 - 1 -					
			(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	3 - - 1 - 1 -					
3	3	1 2 (3) 1	9 - - -	1	12				
		(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	9 - - 1 - 1 -						
		(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	9 - - 1 - 1 -						
		(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	9 - - 1 - 1 -						
		(2) 3 (4) 5 (6) 7 (8) 9	9 - - 1 - 1 -						

Tabelle 6: Fortsetzung

Bezeichnungen nach Pariser Konferenz				Anzahl der Bruchereignisse											
Chrom. Nummer	Arm	Region	Bande	Bande	Region	Region Summe	Arm	Total							
5	p	1	5 (4) 3 (2) 1	6 1 1 - -	5	13	13	60							
			1 (2) 3 (4) 5	3 2 7 1 2											
	q	1	(1) (2) 3 (4) 5	- 3 2 1 2	3	18	47								
			2 (1) 2 (3)	- 1 2 2					7	10					
		3	1 (2) 3 (4) 5	6 - 2 - 7	4	19									
			6	p					2	5 (4) 3 (2) 1	2 - 2 - 3	1	8	10	37
										(2) 1	1 -				
q	1	1 (2) 3 (4) 5 (6)		1 - - 4 -	1	6	27								
		1 (2) 3 (4) 5 (6) 7		7 - 2 - 2 - 1				9	21						
	2	(2) 3 (4) 5 (6) 7		7 - 2 - 2 - 1	9	21									
		X		p				2	2 (1)	7 1	1	9	11	42	
1	-														
q	1		1 (2) 3	- - 4	-	4	31								
			(1) (2) 3 (4) 5 (6) (7) 8	4 3 1 - 1 6 - 3				9	27						
	2		(1) (2) 3 (4) 5 (6) (7) 8	4 3 1 - 1 6 - 3	9	27									

Tabelle 6: Fortsetzung

Bezeichnungen nach Pariser Konferenz				Anzahl der Bruchereignisse							
Chrom. Nummer	Arm	Region	Bande	Bande	Region	Region Summe	Arm	Total			
7	p	2	2 (1)	5 -	1	6	16	48			
		1	5 (4) 3 (2) 1	1 - 5 - 1	3	10					
			1	1	1	-			1	32	
			2	(1) 2	- 13	1			14		
	q	3	(1) 2 (3) 4 (5) 6	- 9 - 2 1 3	2	17					
			2	3 (2) 1	2 1	2	10		12	49	
			1	(2) 1	- 2	-	2				
			1	(1) 2 (3) 4	2 3 4 5 8 3 6	1	10				37
2	(1) 2 (3) 4	5 8 3 6		5	27						
9	p	2	4 (3) 2 (1)	2 2 -	1	5	8	36			
		1	3 (2) 1	1 - -	2	3					
			1	1 (2) 3	1 1 2	1			10		28
			2	(1) 2	3 5	-			8		
	3	(1) 2 (3) 4		3 3 - 3	1	10					

Tabelle 6: Fortsetzung

Bezeichnungen nach Pariser Konferenz				Anzahl der Bruchereignisse				
Chrom. Nummer	Arm	Region	Bande	Bande	Region	Region Summe	Arm	Total
10	p	1	5 (4) 3 (2) 1	- 1 2 - -	1	4	4	26
			1	-				
	q	1	(1) 2 (3) 4 (5) 6	1 6 1 6 - 2	-	2	22	
		2			4	20		
11	p	1	5 (4) 3 (2) 1	2 - 3 - 2	3	10	10	31
			1	-				
	q	1	(2) 3 (4) 1	6 1 1 3	1	9	21	
		2	(2) 3 (4) 5	1 5 - 1		2		
12	p	1	3 (2) 1	1 3 2	2	8	8	40
			1	3				
	q	1	(2) 3 (4) 5	2 1 - 1	1	8	32	
		2	(1) 2 (3) 4	5 2 5 6		6		

Tabelle 6: Fortsetzung

Bezeichnungen nach Pariser Konferenz				Anzahl der Bruchereignisse				
Chrom. Nummer	Arm	Region	Bande	Bande	Region	Region Summe	Arm	Total
13	p	1	3 2 1	2 - -	5	7	7	29
	q	1	1 2 (3) 4	3 1 4 4	2	10	22	
		2	(1) 2 (1) 2 (3) 4	1 2 - - 1	-	3		
		3	(1) 2 (3) 4	- - - 1	8	9		
14	p	1	3 2 1	1 1 -	1	3	3	19
	q	1	1 (2) 3	1 - 1	1	3	16	
		2	(1) 2 (3) 4	2 1 - 3	2	8		
		3	(1) 2	2 2	1	5		
15	p	1	3 2 1	- - -	1	1	1	28
	q	1	1 (2) 3 (4) 5	1 - - - 3	1	5	27	
		2	(1) 2 (3) 4 (5) 6	1 8 1 7 - 3	2	22		

Tabelle 6: Fortsetzung

Bezeichnungen nach Pariser Konferenz				Anzahl der Bruchereignisse				
Chrom. Nummer	Arm Region		Bande	Bande	Region	Region Summe	Arm	Total
16	p	1	3 (2)	3 1	0	12	12	29
			1 (2)	8 1				
	q	1	1 (2)	1 1	2	8	17	
			3 (1)	4 1				
		2	2 (3) 4	3 - 2	3	9		
17	p	1	3 (2)	2 - 2	-	4	4	14
			1 (2)	- -				
	q	1	1 (2)	- 4	-	-	10	
			1 (2) 3 (4) 5	1 - 1 - 1				
18	p	1	1 1	2 2	1	3	3	23
			1 (2)	2 2				
	q	1	1 (2)	8 1	2	6	20	
			1 (2) 3	3 3				
19	p	1	3 (2)	4 - -	-	4	4	11
			1 (2)	- -				
	q	1	1 (2)	- 7	-	7	7	
			3 (2)	7 3				
20	p	1	3 (2)	3 - 2	-	5	5	12
			1 (2)	3 -				
	q	1	1 (2)	3 -	1	7	7	
			3 (2)	3 3				

Tabelle 6: Fortsetzung

Bezeichnungen nach Pariser Konferenz				Anzahl der Bruchereignisse				
Chrom. Nummer	Arm	Region	Bande	Bande	Region	Region Summe	Arm	Total
21	p	1	3	-	-	1	1	5
			2	-				
			1	1				
	q	1	1	1	-	1	4	
		2	(1) 2	- 3	3			
22	p	1	3	-	2	2	2	6
			2	-				
			1	-				
	q	1	1	1	-	4	4	
			(2) 3	- 3				

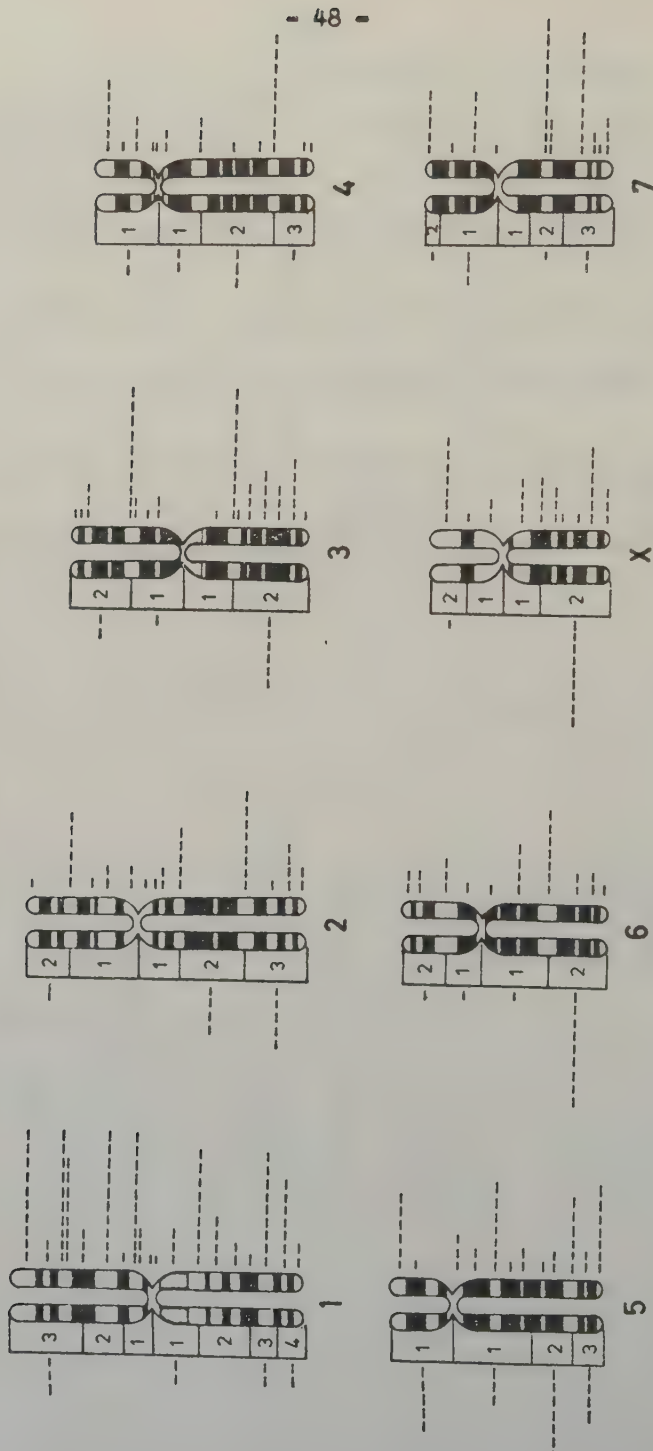


Abbildung 16: Verteilung der Bruchereignisse nach Bandenfärbung. Links vom Chromosom sind jeweils die Brüche angegeben, die nur auf den Bereich der Regionen festzulegen sind.

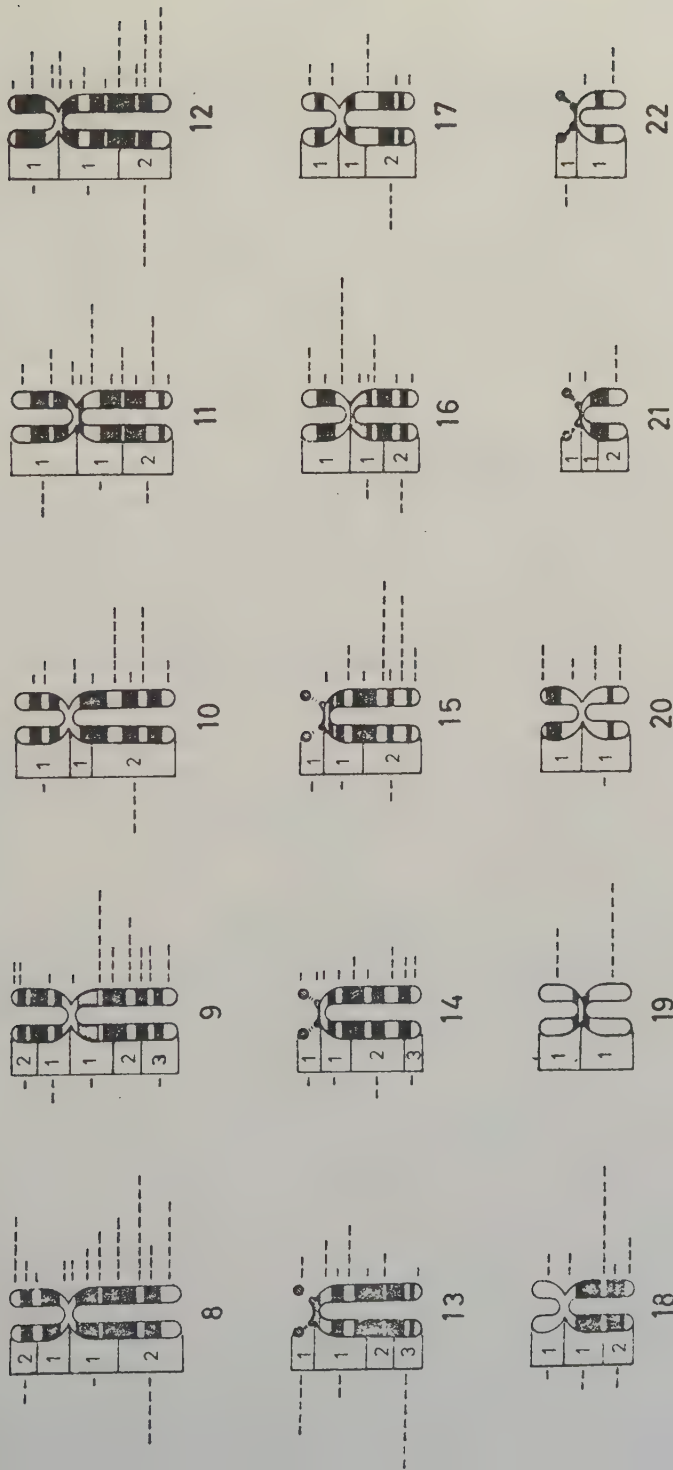


Abbildung 16: Fortsetzung.

Chromosomen- Nummer	Relative Länge	Bruchereignisse:	
		Beobachtet	Theoretisch
1	8,44	105	63,64
2	8,02	47	60,47
3	6,83	57	51,50
4	6,30	39	47,50
5	6,08	60	45,84
6	5,90	37	44,49
X	5,12	42	38,60
7	5,36	48	40,41
8	4,93	49	37,17
9	4,80	36	36,19
10	4,59	26	34,61
11	4,61	31	34,76
12	4,66	40	35,14
13	3,74	29	28,20
14	3,56	19	26,84
15	3,46	28	26,09
16	3,36	29	25,33
17	3,25	14	24,51
18	2,93	23	22,09
19	2,67	11	20,13
20	2,56	12	19,30
21	1,90	5	14,33
22	2,04	6	15,38
Summe	105,11	793	792,52

Tabelle 7: Interchromosomale Verteilung der Brüche

3.2.3.2. Brüche in den Chromosomenarmen

Die Bruchverteilung innerhalb der Chromosomenarme wurde analog 3.2.3.1. analysiert. Nach den Angaben der "Pariser Konferenz" für die Arminizes wurde die relative Länge für p und q ermittelt. In Tabelle 8 sind die beobachteten und die theoretischen Werte angegeben. Auch hier zeigt sich bei einem χ^2 -Wert = 112,62 und einem $P < 0,001$, daß innerhalb der Chromosomenarme eine nicht zufällige Verteilung der Bruchereignisse vorliegt.

Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit P für eine Übereinstimmung von beobachtetem und theoretischem Wert, analog 3.2.3.1. durchgeführt, ergab als einzige Abweichung eine Unvereinbarkeit der Werte bei Nr. 1 ($P = 0,032$) im kurzen Arm. Dies bedeutet, daß hier im Mittel mehr Bruchereignisse als theoretisch errechnet, zu erwarten sind.

Tabelle 8: Bruchverteilung in den Chromosomenarmen.

Chromoso- men-Nummer	Arm	Relative Länge	Bruchereignisse	
			Beobachtet	Theoretisch
1	p	4,08	61	30,76
	q	4,36	44	32,87
2	p	3,15	14	23,75
	q	4,87	33	36,82
3	p	3,21	23	24,20
	q	3,62	34	27,29
4	p	1,83	14	13,80
	q	4,47	25	33,70
5	p	1,78	13	13,42
	q	4,30	47	32,42
6	p	2,30	10	17,34
	q	3,60	27	27,14
X	p	2,05	11	15,46
	q	3,07	31	23,15
7	p	2,09	16	15,76
	q	3,27	32	24,66
8	p	1,68	12	12,67
	q	3,25	37	24,51
9	p	1,70	8	12,82
	q	3,10	28	23,37
10	p	1,56	4	11,76
	q	3,03	22	22,85
11	p	1,85	10	13,95
	q	2,76	21	20,81
12	p	1,41	8	10,63
	q	3,25	32	24,51
13	p	0,64	7	4,83
	q	3,10	22	23,37

Tabelle 8: Fortsetzung

Chromoso- men-Nummer	Arm	Relative Länge	Bruchereignisse	
			Beobachtet	Theoretisch
14	p	0,67	3	5,05
	q	2,89	16	21,79
15	p	0,70	1	5,28
	q	2,76	27	20,81
16	p	1,39	12	10,48
	q	1,97	17	14,85
17	p	1,10	4	8,29
	q	2,15	10	16,21
18	p	0,91	3	6,86
	q	2,02	20	15,23
19	p	1,24	4	9,35
	q	1,43	7	10,78
20	p	1,16	5	8,75
	q	1,40	7	10,56
21	p	0,59	1	4,45
	q	1,31	4	9,88
22	p	0,62	2	4,67
	q	1,42	4	10,71
Summe		105,11	793	792,52

3.2.3.3. Brüche in den Regionen

Eine Untersuchung der längenproportionalen Verteilung von Brüchen im Bereich der Chromosomenregionen kann nicht durchgeführt werden, da es bisher keine Standardmessungen für G-Bandenregionen gibt. Die beobachteten Brüche sind deshalb in Tabelle 9 als prozentualer Anteil der Gesamtbruchereignisse im betreffenden Chromosom angegeben.

In den Chromosomen Nr. 6, X, 8, 10, 12, 15 und 17 bis einschließlich 22 liegen jeweils über 50 % der Brüche in der äußeren Telomerregion des langen Armes. Eine Bevorzugung dieser Regionen ist auch bei einigen anderen Chromosomen, wenn auch nicht in diesem hohen Prozentsatz, festzustellen. (Nr. 2, 4, 7, 11 und 16). Nur das Chromosom Nr. 9, das im langen Arm eine nahezu gleichmäßige Bruchverteilung zeigt, sowie Nr. 13 und Nr. 14 mit Maxima im medianen, bzw. submedianen Bereich, machen eine Ausnahme.

3.2.3.4. Brüche in den Banden

Aussagen über die Bruchverteilung auf einzelne Banden sind am schwierigsten zu machen, da die Zuordnung zu sehr schmalen, eng beieinanderliegenden Banden oft sehr subjektiv ist. (Tabelle 6, Abbildung 16). Selbst bei der hier untersuchten relativ hohen Zahl von Zellen sind daher die vorliegenden Zahlenwerte für eine sinnvolle statistische Analyse noch zu niedrig. Aus diesem Grund wurden lediglich die prozentualen Anteile der Brüche in positiven und negativen Banden errechnet. Das Ergebnis zeigt Tabelle 10. Die Summe der Bruchereignisse ist hier niedriger als in den Tabellen vorher, weil Brüche, die nur in den Regionen lokalisierbar waren, nicht mit eingehen.

Tabelle 9: Verteilung der Brüche in Regionen.
Anzahl der Brüche = Brüche, die nur in
Regionen + Brüche, die in Banden lokali-
sierbar waren. (Siehe auch Tabelle 6).
Gesamtbruchanzahl im betreffenden
Chromosom = 100 %.

Chromosom Nummer	Region Nummer	Anzahl der Brüche	%
1	3	35	34,29
	2	11	10,48
	1	14	13,33
	1	6	5,71
	2	15	14,29
	3	12	11,43
	4	11	10,48
2	2	9	19,15
	1	5	10,64
	1	4	8,51
	2	9	19,15
	3	20	42,55
3	2	19	33,33
	1	4	7,02
	1	1	1,75
	2	33	57,89
4	1	14	35,90
	1	4	6,78
	2	9	23,08
	3	12	30,77
5	1	13	21,67
	1	18	30,00
	2	10	16,67
	3	19	31,67
6	2	8	21,62
	1	2	5,41
	1	6	16,22
	2	21	56,76
X	2	9	21,43
	1	2	4,76
	1	4	9,52
	2	27	64,29
7	2	6	12,5
	1	10	20,83
	1	1	2,08
	2	14	29,17
	3	17	35,42
8	2	10	20,41
	1	2	4,08
	1	10	20,41
	2	27	55,10

Tabelle 9: Fortsetzung

Chromosom Nummer	Region- Nummer	Anzahl der Brüche	%
9	2	5	13,89
	1	3	8,33
	1	10	27,78
	2	8	22,22
	3	10	27,78
10	1	4	15,38
	1	2	7,69
	2	20	76,92
11	1	10	32,26
	1	9	29,03
	2	12	38,71
12	1	8	20,00
	1	8	20,00
	2	24	60,00
13	1	7	24,14
	1	10	34,48
	2	3	10,34
	3	9	31,03
14	1	3	15,79
	1	3	15,79
	2	8	42,11
	3	5	26,32
15	1	1	3,57
	1	5	17,86
	2	22	78,57
16	1	12	41,38
	1	8	27,59
	2	9	31,03
17	1	4	28,57
	1	-	-
	2	10	71,43
18	1	3	13,04
	1	6	26,09
	2	14	60,87
19	1	4	36,36
	1	7	63,63
20	1	5	41,67
	1	7	53,33
21	1	1	20,00
	1	1	20,00
	2	3	60,00
22	1	2	33,33
	1	4	66,67

Chromoso- men-Nummer	Brüche in positiven Banden		Brüche in negativen Banden		Gesamtzahl lokalisier- ter Brüche
	Anzahl	%	Anzahl	%	
1	8	8,34	88	91,66	96
2	1	2,78	35	97,22	36
3	6	12,24	43	87,76	49
4	3	10,00	27	90,00	30
5	6	14,63	35	85,37	41
6	2	8,00	23	92,00	25
X	7	21,87	25	78,13	32
7	1	2,44	40	97,56	41
8	14	34,15	27	65,85	41
9	9	29,03	22	70,97	31
10	3	14,29	18	85,71	21
11	3	12,00	22	88,00	25
12	14	45,16	17	54,84	31
13	2	14,29	12	85,71	14
14	4	28,57	10	71,43	14
15	2	8,33	22	91,67	24
16	3	12,50	21	87,50	24
17	0	0,00	10	100,00	10
18	3	16,67	15	83,33	18
19	0	0,00	11	100,00	11
20	0	0,00	11	100,00	11
21	0	0,00	5	100,00	5
22	0	0,00	4	100,00	4
Summe	92	14,72	533	85,28	625

Tabelle 10: Verteilung der Brüche in positiven und ne-
gativen Banden. Die Gesamtzahl lokalisier-
ter Brüche im einzelnen Chromosom entspricht
100 %.

Es ist offensichtlich, daß die negativen Banden als Orte der Bruchereignisse deutlich bevorzugt sind:

85,3 % der lokalisierbaren Brüche liegen in den negativen Banden. Die einzelnen Chromosomen haben einen Anteil von über 80 % der Brüche in den negativen Banden, außer Nr. X, 9 und 14 mit einem Prozentsatz über 70. Im Chromosom Nr. 8 beträgt der Anteil 65,9 %, Nr. 12 zeigt eine annähernd gleiche Bruchverteilung in positiven (45,2 %) und negativen (54,8 %) Banden.

4. DISKUSSION

4.1. Methodik

Nach Art des verwendeten Farbstoffs, bzw. nach dem Auftreten der Banden in bestimmten Regionen der Chromosomen, können im Wesentlichen vier Techniken unterschieden werden: C-, Q-, R- und G-Bandentechnik. Die Begründung dafür, daß die Fragestellungen dieser Arbeit mit einer G-Bandentechnik bearbeitet wurden, ergibt sich aus der folgenden, kurzen Darstellung der anderen Techniken.

Versuche an Mäusechromosomen mit radioaktiv markierter DNA zeigten, daß die Sequenzen der Satelliten-DNA im Centromerbereich liegen (53). Diese Regionen färbten sich mit Giemsa nach Vorbehandlung mit NaOH dunkler an als der Rest des Chromosoms (2,3,21,26,39,40,46) und werden als C-Banden (C=Centromer) bezeichnet. Sie haben zwar den Vorteil leicht reproduzierbar zu sein, aber sie ermöglichen, da alle Chromosomen nur im Centromerbereich gefärbt werden, keine exakte Klassifizierung der Chromosomen.

Eine Anfärbung der terminalen Chromosomenbereiche (T-Banden, 59) oder der Nukleolus-Organisator-Regionen (N-Banden, 27) ist ebenfalls für eine exakte Nummerierung nicht geeignet, weil auch sie sich nur auf Teilbereiche der Chromosomen beschränkt.

Die Q-Banden entstehen nach einer Färbung mit Quinacrin-dihydrochlorid oder mit Quinacrinlost und werden als gut reproduzierbar beschrieben.

(14, 15, 24, 31, 44, 45, 52). Sie lassen sich als fluoreszierende Abschnitte auf den Chromosomen nicht immer optimal fotografieren. Darüber hinaus können keine Dauerpräparate hergestellt werden.

Im Gegensatz dazu ist die Präparation der G-Banden beständig. Das G-Bandenmuster ist klarer, detaillierter und in einem höheren Prozentsatz von Metaphasen zu beobachten (64). Auch zeigen kontrahierte Chromosomen eine größere Anzahl G-Banden als Q-Banden (64).

R-Banden erhält man nach Denaturierung der DNA bei 87° - 88° C und anschließender Färbung mit Giemsa (16). Das Bandenmuster ist ähnlich dem nach Q- oder G-Bandenfärbung, allerdings entsprechen positiv gefärbte Abschnitte bei den Q- und G-Banden negativ gefärbten Regionen bei den R-Banden (R = reserve-staining). In den wenigen Veröffentlichungen, die sich mit R-Banden beschäftigen (13, 16, 60) scheinen die Banden weit weniger klar voneinander abgegrenzt zu sein, als das bei G-Banden der Fall ist.

4.1.1. Chromosomenpräparation

Wenn eine G-Bandenfärbung folgen soll, wird in der Literatur als hypotonische Lösung 0,85 %-ige Na-Citratlösung (10, 23), 0,3 %-ige NaCl-Lösung (45) oder Gey's Lösung, verdünnt mit drei Teilen Wasser (64), verwendet. Auffallend häufig ist der Gebrauch von 0,075 M KCl-Lösung, wobei die Zeiten der Einwirkung bei einer Temperatur von 37° C zwischen 3 und 10 Minuten (39, 66, 72, 76, 79, 80), bei Raumtemperatur zwischen 12 und 15 Minuten (65) schwanken. Kein Autor verwendet dagegen mit Wasser verdünnte Hank'sche Lösung.

Wegen der weitgehenden Ähnlichkeit von Gey- und Hank'scher Lösung könnte dies aber dafür sprechen, daß die ionale Zusammensetzung und Konzentration für die Entstehung von Banden entscheidend ist. Auch in der vorliegenden Arbeit waren erst dann positive Ergebnisse der Färbeversuche zu erreichen, nachdem Hank's durch KCl ersetzt worden war (siehe 3.1.). Das bestätigt die Ansicht, daß KCl-Lösung die Chromosomenstruktur am wenigsten beeinträchtigt (80) und daher sehr gut als hypotonische Lösung bei einer nachfolgenden G-Bandenfärbung geeignet ist.

Als Fixativ wird in allen bisher zitierten Arbeiten eine Methanol-Eisessig-Mischung (3:1) verwendet, die nur eine sehr geringe (73) oder gar keine (80) Denaturierung chromosomaler DNA bewirkt.

Ein langsames Trocknen der aufgetropften Präparate an der Luft (11, 13, 45, 72, 79), bis höchstens 35° C (45) oder bis 40° C (79) ist der Verwendung der Bunsenbrennerflamme vorzuziehen, da sich hohe Temperaturen ungünstig auf die Entstehung von Banden auswirken (38, 66). Möglicherweise beruht das auf einer Denaturierung der DNA (80) und vielleicht in erhöhtem Maß auch auf dem Hydratationszustand der Chromosomen.

In diesem Zusammenhang wird postuliert, daß durch Entwässern in absolutem Methanol oder durch Aufbewahren der Präparate in einem Exsikkator eine Verbesserung des Bandenmusters erreicht werden kann (80). Auf Grund der eigenen Experimente kann gesagt werden, daß dies nicht entscheidend für gute Ergebnisse ist. Wohl aber könnte im Zusammenhang mit dem Hydratationszustand der Chromosomen das Alter der fertig aufgetropften und getrockneten Präparate

für die Bandenbildung eine Rolle spielen (26, 60).

Wenn auch die Zellsuspension in der Methanol-Eisessig-Mischung nach eigener Erfahrung mindestens 1 - 2 Tage aufbewahrt werden kann - es wird sogar ein Zeitraum von einigen Monaten dafür genannt (76, 80) -, so ist doch die Verwendung der fertigen Präparate für eine Bandenfärbung begrenzt. Die Angaben für eine Aufbewahrung ohne Nachteile für die Bandenfärbung reichen von 6 Stunden (40), über einen (70) bis zwei Tage (80). Es ist auf jeden Fall anzuraten, die Präparate bald nach ihrer Herstellung zu färben. Auch durch verschiedene Aufbewahrungsarten kann nicht vermieden werden, daß die Musterung undeutlich und schwach gegenüber frischen Präparaten wird. Eine Erklärung dafür muß wahrscheinlich im Mechanismus der Färbung zu suchen sein.

4.1.2. Bandenfärbung

Die verschiedenen Techniken der Bandenfärbung unterscheiden sich vor allem in den vor der eigentlichen Färbung angewandten Verfahren, die als unerläßliche Voraussetzungen für die Entstehung eines Bandenmusters beschrieben werden. Man unterscheidet dabei im Wesentlichen drei Arten der Vorbehandlung:

- a) 0,07 NaOH für 2 sec (38), 30 sec (23) oder 90 sec (64) und anschließend Einwirkung einer Salzlösung (23, 64);
- b) 0,25 %-ige Trypsinlösung (verdünnt mit Kochsalzlösung) für 10 - 15 sec (56, 66, 70), bzw. 10 - 30 sec (43);
- c) Salzlösungen verschiedener Zusammensetzung, Temperatur und Einwirkungsdauer (10, 38, 45, 55, 60, 72).

Unter c) ist die ASG-Methode (72) als grundlegende Technik, die vielfach modifiziert wurde (4, 11, 18, 34, 52, 66, 78), hervorzuheben (A=acetic, S=saline, G=Giemsa). Aus eigenen Versuchen und zwei anderen Arbeiten (79, 80) geht hervor, daß eine Vorbehandlung, gleich welcher Art, keineswegs eine notwendige Voraussetzung der Bandenentstehung ist. Vermutlich wirken sich die verwendeten Reagenzien nicht negativ auf eine anschließende Färbung aus, das Bandenmuster selbst wird aber sicher nicht durch sie hervorgerufen. Alle hier gezeigten Karyogramme (Abbildung 5 bis 13) sind Photographien von Präparaten ohne Vorbehandlung.

Für die eigentliche Färbung der Präparate gibt es viele unterschiedliche Vorschläge. Die Wahl des Farbstoffs, die Menge und die Zusammensetzung des Lösungsmittels sowie die Färbezeit sind kritische Punkte (23, 79). Als Farbreagenz kommen in Frage: Gurr's Giemsa (72), Harleco Giemsa Blood Stain (55), Alcian blue 8 GX (80) und vor allem Leishman Methylenblau (41, 43, 66, 70, 79) und Giemsa von Merck (10, 38, 45, 52, 64, 79). Zum Verdünnen der Farbstammlösungen werden in den meisten Fällen Phosphat-Pufferlösungen (10, 23, 25, 38, 41, 43, 45, 52, 55, 66, 70, 72, 79, 80), aber auch 0,35 %-ige NaCl-Lösung (38) und Aqua dest. (30, 60) verwendet.

Eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von G-Banden ist mit Sicherheit die Konzentration der Farblösung. Es kann bestätigt werden, daß erst eine 1 - 10 %-ige Farblösung (Giemsa-Stammlösung + Puffer) zu Bandenmustern (79, 80) führt. Die Konzentration von Leishman Methylenblau muß allerdings deutlich höher sein (1 Teil Leishman auf 4 Teile Puffer).

Das Bandenmuster der Chromosomen ist bei den beiden Farblösungen gleich. Die Struktur wirkt mit Leishman allerdings manchmal leicht verdickt. Ob diese Erscheinung auf die Wirkung unterschiedlicher Kationenkonzentrationen in den Farblösungen zurückzuführen sein könnte, erscheint jedoch ungewiß (79). Ein anderer Unterschied zwischen Giemsa und Leishman ist, daß sich die Ergebnisse bei einer Erwärmung der Leishmanlösung auf 40° C verbessert haben, was für die Giemsalösung nicht zutraf. Es wurde jedoch Merck Giemsa verwendet, das nur bei Raumtemperatur, nicht aber bei Temperaturen von 40-45° C Banden produzieren soll (78). Die Vermutung, daß die Temperatur eine Vorbedingung für Banden ist, könnte durchaus zutreffen, wurde hier aber nicht systematisch überprüft.

Ein wichtiger Faktor ist dagegen die Elektrolytkonzentration, wobei es vor allem auf den richtigen pH-Wert ankommt. Der gebräuchlichste pH-Wert liegt knapp unter dem Neutralpunkt (23, 38, 41, 43, 52, 64, 66, 72, 77, 79). Eine Bandenfärbung völlig unabhängig vom pH-Wert (45) ist kaum denkbar, eher scheint zuzutreffen, daß, je nach pH, verschiedene Banden entstehen (60), und zwar um den Neutralpunkt G-Banden und bei Verschiebung in den sauren Bereich R-Banden.

Auch die Zeit der Färbung hat einen ausschlaggebenden Einfluß. Dafür werden Vorschläge von 2 Minuten (78) bis 1 1/2 Stunden (72) gemacht. Bei Verwendung von Giemsa treten nach kurzen Färbezeiten

(1-2 Minuten) nur C-Banden auf (55), in längeren Zeiten (über 10 Minuten) werden die Chromosomen aber einheitlich dunkel (38, 55). Für eine Giemsa-Färbung ist daher eine Zeit von 5 - 12 Minuten, für eine Leishman-Färbung 15 - 25 Minuten optimal.

Ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von Banden ist der Kontraktionszustand der Metaphasen. Es wurde vielfach beobachtet, daß Prometaphase-Chromosomen eine größere Anzahl von Banden aufweisen, als späte Metaphase-Chromosomen (4, 10, 19, 64, 80, 81). Ein mittleres Metaphasenstadium ist für die Bandenfärbung am besten geeignet. In zu frühen oder zu späten Stadien sind die homologen Chromosomen schlechter zu erkennen (55). Stark kontrahierte Chromosomen sind insbesondere für eine Analyse von Bruchstellen nicht zu verwenden, weil sie sehr wenige oder gar keine Banden zeigen.

4.1.3. Charakteristisches Bandenmuster

Das charakteristische Bandenmuster, das sich aufgrund der hier erarbeiteten Methode ergibt, zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Schema, das 1971 von der Pariser Konferenz erstellt wurde. Allerdings ist zu betonen, daß die Pariser Konferenz das Schema auf der Grundlage von Q-, R- und G-Bandenmustern erarbeitet hat, während das "charakteristische" Karyogramm (Abbildung 1) hier ausschließlich auf G-Bandenfärbung beruht.

Mit dem Begriff "Bandenmuster" sind sowohl die positiven (dunkel) als auch die negativen (hell) Banden gemeint. Gerade die negativen Banden tragen

wesentlich zur Klassifizierung bei und ermöglichen zum Beispiel die Unterscheidung zwischen Chromosom Nr. 4, mit einer schmalen Interbande im terminalen Bereich des langen Armes und Nr. 5 mit einer breiteren Interbande an derselben Stelle. Auch bei der Erkennung von Chromosom Nr. 3, 6, 11, 12, 14 und 17 sind sie eine entscheidende Hilfe.

Die Übereinstimmung mit dem "Pariser Schema" trifft vor allem für die Chromosomen Nr. 1, 2, 5, 8-10, 16-18 und 20-22 zu. Die im "Pariser Schema" als variabel gekennzeichneten Banden waren hier allerdings dunkel gefärbt, und zwar: ausnahmslos in Nr. 1, nahezu ausnahmslos in Nr. 16, vielfach in Nr. 13, 14 und 22, niemals jedoch in Nr. 21. Bei den Banden 21 p11 13 handelt es sich um einen sehr kleinen Chromosomenabschnitt (kurzer Arm). Nr. 21 und Nr. 22 kann aber sicher an Hand einer dunklen Bande im langen Arm von Nr. 21, die in Nr. 22 nicht auftritt, unterschieden werden.

Für die Erfassung sehr schmaler Banden kommt es offensichtlich entscheidend auf deren Lage innerhalb eines Chromosomenarmes an. Die relativ schmale Bande q12 von Nr. 20 des "Pariser Schemas" war in 96 % der Karyogramme zu sehen, während zum Beispiel die Bande 13 q33 nur in 4 % der Karyogramme erkennbar war. Im Gegensatz zu der Bande 13 q33, die in unmittelbarer Nähe einer breiten, positiven Bande, 13 q31, liegt und leicht in diese miteingehen kann, ist 20 q12 von großen Euchromatinregionen umgeben. Es sieht so aus, als müßte ein euchromatisches Zwischenstück eine bestimmte Ausdehnung erreichen, um die Erkennbarkeit einer positiven Bande sicherzustellen.

Oft verschmelzen nämlich dicht nebeneinander liegende Banden, das heißt es erscheint nur eine breite Bande, innerhalb der keine Differenzierung möglich ist, zum Beispiel:
2 q22+24,3 q22+24+26,4 q22-28 usw. Andererseits treten schmale Banden durchaus häufig auf, wenn sie von breiten Euchromatinregionen (negativen Banden) begrenzt werden, zum Beispiel: X q12,22 q12 und 20 q12.

Als Vergleich zu dem unter 3.1.3. beschriebenen "Charakteristischen Bandenmuster" soll zunächst ein "Average Karyotype" von SEABRIGHT (69) benutzt werden, der durch Messungen an 15 Mitosen erhalten wurde. Er basiert auf einer Färbung mit Leishman-Methylenblau, der eine Behandlung der Präparate mit verdünnter Trypsinlösung vorausging (siehe auch 4.1.2.). Dieses Karyogramm stimmt mit dem hier erarbeiteten Bandenmuster und dem "Pariser Schema" in vielen Chromosomen überein, wenn man ausschließlich die typischen Banden berücksichtigt. Das trifft zu für die Chromosomenarme 1 q, 6 p, 9 q, bzw. für die Chromosomen Nummer 3-5, 7, 11-14, 16, 18, 19, 21 und 22. Eine Abweichung vom "Pariser Schema" und dem hier erstellten Bandenmuster ergibt sich für Nummer 2, 8, 9 q, 10, 15 und 20, während Nummer 1 p, 17 und X sich sowohl hier, als auch bei SEABRIGHT vom "Pariser Schema" unterscheiden.

Nach SEABRIGHT haben die Chromosomen Nummer 19 und Nummer 20 jeweils nur eine Bande im Centromerbereich, was eine Unterscheidung unmöglich macht. Im "Pariser Schema" und nach der hier beschriebenen Methode gehören dagegen die Banden 20 p12 und 20 q12 mit 98% und 96% zu den sehr sicher auftretenden Banden.

Im Centromerbereich von Nummer 20 erscheint nur in 6% der Fälle eine Bande, die allerdings im "Pariser Schema" keinerlei Entsprechung hat. Bei Nummer 1, 2 und 17 werden nach der Seabright-Methode weniger, bei Nummer 4, 6 und X mehr Banden gezählt als im charakteristischen Bandenmuster von Abbildung 1.

Ein Vergleich mit dem von RAY (56) ermittelten Bandenmuster, das ebenfalls auf einer Kombination von Trypsin und Leishman-Methylenblau beruht, zeigt, wie auch bei SEABRIGHT, eine auffallende Häufung positiver Banden im Centromerbereich, so bei Nummer 2, X, 6-8, 10, 20 und 22, die im "Pariser Schema" nicht festzustellen ist.

Die Banden von RAY, die zur Identifizierung der Chromosomen benützt werden, stimmen sehr gut mit den typischen Banden des vorliegenden charakteristischen Karyogramms überein, wenn man vernachlässigt, daß hier einige dicht nebeneinanderliegende Banden verschmelzen. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß SEABRIGHT insgesamt 15, RAY 20 Metaphasen untersucht hat, zudem kann man davon ausgehen, daß dafür gute, bis ideal gefärbte Zellen ausgewählt wurden. Bei den hier zur Charakterisierung verwendeten Karyogrammen handelt es sich dagegen um Mitosen unterschiedlicher Qualität. Dadurch erklärt sich auch die in manchen Chromosomen auftretende geringere Anzahl von Banden.

Außerdem stammen die 15 von SEABRIGHT und die 20 von RAY ausgewählten Zellen jeweils von 5 verschiedenen Personen. Die Zahl der Versuchspersonen könnte dann von Bedeutung sein, wenn das Zustandekommen der Banden durch Trypsin in Beziehung zur

Verteilung und Art des vorhandenen Heterochromatins steht. Nach CRAIG-HOLMES (21) gibt es nämlich sehr viele verschiedene Heterochromatinsorten (er fand 7 Varianten in 4 Individuen).

RAY macht den Vorschlag für Trypsin-Banden eine andere Nomenklatur zu verwenden: "The major difference was the use by the Paris report of negative bands as landmarks, whereas only dark bands have been used in the present study as these seem to be more constant in appearance".

Wenn man das Centromer als "landmark" vernachlässigt, denn dieses steht ja immer, unabhängig von der Färbung fest, so zählt man aber im "Pariser Schema" von insgesamt 38 landmarks 23 in positiven und 15 in negativen Banden, das heißt, die Mehrzahl der landmarks liegt auch dort in positiven Banden.

Bezüglich der Persistenz von landmarks gilt bei vorliegendem charakteristischen Karyogramm, daß diese mit dem "Pariser Schema" in 69% übereinstimmen. Wo die landmarks nicht übereinstimmen liegt es daran, daß zwei positive Banden miteinander verschmolzen sind und dazwischen eine schmale, negative Bande als landmark lag, etwa in 5 q1/2 (=landmark zur Trennung von Region 1 und 2), Nummer 11 und 12 je q1/2, Nummer 14 und 15 je q1/2, oder es ist darauf zurückzuführen, daß die in Frage kommenden Banden in weniger als 75% der Karyogramme vorkamen, wie bei 1 q3/4, 6 q1/2, 7 q2/3, 8 q1/2, X q1/2 und Nummer 13 q1/2/3.

Eine weitere Unterteilung der Banden, wie sie RAY vorgeschlagen hat, wäre zwar für die hier gestellten Fragen vorteilhaft, da sie noch genauere Bruchlokalisationen ermöglichen würde, sie wäre aber sicher nur an optimal gefärbten Mitosen durchführbar. Das wiederum würde aber eine derartige Einschränkung der auswertbaren Zellzahlen bedeuten und somit den Zeitaufwand für solche Untersuchungen noch weiter erhöhen.

Neben den von SEABRIGHT (69) und RAY (56) erhobenen und hier näher erläuterten Bandenmustern sind in der Literatur noch weitere Schemata angegeben (19, 23, 28, 31, 64). Sowohl im Vergleich zum vorliegenden charakteristischen Bandenmuster als auch zum Pariser Schema sind immer wesentliche Übereinstimmungen, aber auch im Detail Verschiedenheiten festzustellen, die sicherlich auf methodische Ursachen zurückzuführen sind.

4.1.4. Hypothesen zum Mechanismus der Bandenfärbung
Welcher chemische Mechanismus der Entstehung von Bandenmustern zugrunde liegt, ist noch weitgehend ungeklärt. In den ersten Arbeiten, die eine differenzielle Färbetechnik beschreiben, wurden De- und Renaturierungsprozesse als mögliche Erklärung angenommen (45, 64, 72). Dabei sollten sich bei höheren Temperaturen (69°C) (45), beziehungsweise durch Behandlung mit heißer Salzlösung (72) oder durch NaOH (64), die Adenin-Thymin-Nukleotidpaare der DNA zu ungeordneten Fäden umlagern, während Guanin-Cytosin von dieser Denaturierung nicht betroffen würde. Positive Banden wären demnach gleichbedeutend mit Adenin-Thymin-Regionen, negative Banden mit Guanin-Cytosin-Regionen oder umgekehrt.

Da aber auch bei niedrigeren Temperaturen, also ohne Denaturierung, eine Bandenfärbung möglich ist (zum Beispiel die Q-Bandenfärbung), wurde diese erste Hypothese bald verworfen (48, 73, 75). Es folgten andere Erklärungen:

- Banden sollen als Folge unterschiedlicher Proteindisulfid und -sulfhydryl-Konzentrationen im Chromosom auftreten (75). Positive Banden sind demnach relativ reich an Disulfiden, negative an Sulfhydrilen. Da Sulfhydrile durch den Luftsauerstoff zu Disulfiden autoxydiert werden, können gelagerte Präparate nach einer Giemsa-Färbung kein Bandenmuster mehr zeigen, da nur noch Disulfide vorhanden sind, welche die einheitlich dunkel gefärbten Chromosomen bedingen.
- Banden sind das Ergebnis einer Interaktion von Farbstoffmolekülen mit DNA und/oder nicht-

histonischen Proteinen, da diese die Hauptkomponenten der fixierten Chromosomen sind (73).

- Da die G-Banden den Q-Banden sehr ähnlich sind, können Variationen im DNA-Gehalt oder in der Verfügbarkeit der DNA eine Musterung der Chromosomen hervorrufen (55).
- Banden und Interbanden sind vielleicht Reflexionen der Konzentration und Anordnung von Nukleoproteinfasern innerhalb spezifischer Chromosomenregionen. Daraus könnten Unterschiede im DNA-Typ (repetitiv oder nicht-repetitiv) und/oder im Protein-Typ (basisch oder sauer) resultieren (48, 80).
- Da man mit einer Phasenkontrastoptik gelegentlich auch ohne Färbung eine Musterung der Chromosomen erkennen kann (47, 48), liegt die Vermutung nahe, daß ein Bandenmuster die originale Chromosomenstruktur darstellt (79, 80). In welcher Beziehung sich allerdings die positiven und negativen Banden in ihrem chemischen Aufbau unterscheiden, muß erst noch näher untersucht werden.

Diese letzte Hypothese würde sehr gut erklären, daß vorbehandelte Schritte bei der Bandenfärbung nicht notwendig sind.

4.2. Bestrahlungsversuche

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den Befunden anderer Autoren läßt nur dann exakte Schlüsse zu, wenn Bestrahlungs- und Kulturbedingungen, sowie die mathematisch-statistische Behandlung der Daten weitgehend übereinstimmen. Diese Voraussetzungen sind für die bereits früher, im gleichen Labor durchgeführten Experimente (62) mit nachfolgender konventioneller Chromosomenfärbung gegeben.

4.2.1. Aberrationstypen

Eine genaue Analyse des Karyotyps wird dadurch möglich, daß mit Hilfe der Bandenfärbung jedes Chromosom individuell angesprochen werden kann. Das wirkt sich besonders auf die Erfassung bestimmter, nach konventioneller Färbung schwer zu erkennen-der Aberrationstypen aus. So können insbesondere die meisten acentrischen Fragmente eindeutig klassifiziert werden. Die überwiegende Zahl ist auf terminale Deletionen zurückzuführen. Es persistieren somit eine große Anzahl offener Brüche. Auch die Zuordnung zu Austauschprozessen ist möglich. Vergleicht man die Häufigkeiten der acentrischen Fragmente aus der Analyse nach Bandenfärbung (ac - B, Tabelle 2) mit jenen nach konventioneller Technik (Tabelle 3), so könnte man zunächst annehmen, daß bei konventioneller Färbung eine Zuordnung in die Kategorie ac_1 (unter der Annahme kompletter Austauschprozesse, wird nur ein Fragment zum Austausch gerechnet, alle übrigen sind zusätzliche Deletionen) zweckmäßiger ist, als in die Kategorie ac_2 .

Inwieweit diese Annahme gerechtfertigt ist, soll im Kapitel 4.2.2. bei der Interpretation der Dosis-Wirkungsbeziehung für acentrische Fragmente erläutert werden.

Bei der Analyse atypischer, durch Strukturumbau entstandener Chromosomen zeigt sich der eindeutige Vorteil der Bandenfärbung. Nach konventioneller Färbung wurde nur 1/10 dieser Figuren erfaßt (Tabelle 2 und 3). Viele Translokationen werden also nicht als atypische Chromosomen gezählt, weil die translozierten Abschnitte ohne Bandenfärbung nicht erkennbar sind. Andere symmetrische, inkomplette Translokationen gehen in die Analyse nur als Deletionen ein (Abbildung 4). In solchen Fällen kommt es bei Bestimmung der Gesamtbruchereignisse zu einer starker Unterschätzung, da Strukturumbauten als Zweibruchereignisse zu behandeln sind. Abbildung 3 zeigt, daß bei konventioneller Färbung die Situation auch durch Karyotypierung kaum zu verbessern ist, da allein durch unterschiedliche Spiralisations- und Quellungs-zustände einzelner Chromosomen die Zuordnung der homologen Chromosomen erschwert wird.

Unsymmetrische Austauschprozesse treten etwa dreimal häufiger als symmetrische Figuren auf (Abbildung 4). Dies weicht von dem 1:1 Verhältnis ab, das auf Grund theoretischer Vorstellungen postuliert wird und nach denen für beide Prozesse jeweils zwei Brüche notwendig sind.

CASPERSSON (17) fand nach Q-Bandenanalyse etwa gleich viele dicentrische Chromosomen (unsymmetrische Interchanges) wie Translokationen (symmetrische Interchanges). Zu ähnlichen Ergebnissen kam BUCKTON (13) nach kombinierter G- und R-Bandenfärbung in weiblichen Zellen, während in männlichen Zellen ein Verhältnis von 2:1 auftrat. Da Euchromatinregionen durch eine G-Bandenfärbung nicht sichtbar gemacht werden, wohl aber durch Q- und R-Bandenfärbung, sind sicherlich sehr kleine Euchromatinregionen (negative G-Banden), die an einer Translokation beteiligt sind, hier nicht erfaßt. Somit dürfte die Zahl der Translokationen sowie die Zahl der auch mit Bandenfärbung nur schwer zu erfassenden peri- und paracentrischen Inversionen tatsächlich höher sein, als sie hier ermittelt wurde.

Da die vorliegenden Befunde nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen erhoben wurden, CASPERSSON und BUCKTON in ihren Experimenten jedoch jeweils nur mit einer einzigen Dosis bestrahlten, liegt auch der Schluß nahe, daß hier allein schon wegen der Dosis-Effekt-Beziehung andere Zahlenverhältnisse auftreten können.

4.2.2. Dosis-Wirkungsbeziehung

Zur Aufstellung von Dosis-Wirkungskurven versucht man, die theoretischen Modelle der Dosis-Wirkungsbeziehungen mit möglichst großer statistischer Sicherheit an die empirischen Daten anzupassen. Die Güte einer solchen Anpassung hängt wesentlich von der Zahl der ausgewerteten Zellen ab.

Im vorliegenden Fall konnten die Befunde für dicentrische Chromosomen und acentrische Fragmente jeweils am besten mit einer Potenzfunktion beschrieben werden (Tabelle 4). Die daraus resultierenden Dosis-Wirkungskurven können sicherlich nicht als repräsentativ angesehen werden, vor allem auch deshalb nicht, weil schon in einer früheren Arbeit aus diesem Labor (62) gezeigt werden konnte, daß die beste Anpassung immer bei einem linear-quadratischen Modell ($Y = c + \alpha D + \beta D^2$) gegeben war. Eine Anpassung dieses Modells war hier schon auf Grund der geringen Zahl von nur 800 Zellen kaum zu erwarten.

Vergleicht man die vorliegenden, jeweils nach konventioneller bzw. Bandenfärbung erstellten Dosis-Wirkungskurven für die beiden Aberrationstypen, so zeigt sich, daß man zu vergleichbaren Aussagen kommt. Die Dosis-Wirkungskurven für die Chromosomen nach Bandenfärbung (dic-B) sowie nach konventioneller Färbung aus der oben zitierten Arbeit (dic-K, 62) sind ebenfalls identisch (Tabelle 5). Dies ist ein wesentliches Ergebnis, da einerseits die Befunde mit Bandenfärbung nach schärferen Auswertungskriterien erhoben wurden (gut gespreitete, nicht zerrissene Metaphasen und zusätzlich gute Bandenmuster) und anderer-

seits die früheren Kurven dieses Labors auf 2500 analysierten Zellen basieren.

Im Gegensatz zu den Befunden für dicentrische Chromosomen sind die Dosis-Wirkungsbeziehungen für ac-B weder mit jenen für ac₁-K (62) noch für ac₂-K (62) identisch, obwohl keine Unterschiede bei einem Vergleich der eigenen Befunde für ac-B zu ac₁-K und ac₂-K errechnet wurden (Tabelle 5). Letzteres hat sicher statistische Gründe, da zwar jeweils die gleichen Zellzahlen zugrunde liegen, aber die Gesamtzahlen sicher noch zu gering sind, um definitive Aussagen machen zu können. Die Unterschiede zwischen den Dosis-Wirkungskurven für ac-B und ac₁-K (62) bzw. ac₂-K (62) erklären sich durch die Entstehungsweise acentrischer Fragmente, die sowohl durch terminale als auch durch interkalare Bruchstückverluste erfolgen kann. Bei konventioneller Färbung können diese Prozesse aber nicht voneinander unterschieden werden. Ebenso kann in Zellen mit mehreren Fragmenten und Austauschaberrationen nicht erkannt werden, wieviele Fragmente zum Austausch gerechnet oder als zusätzliche Deletionen gezählt werden müssen (Abbildung 4). Selbst der Versuch einer speziellen Bewertung von acentrischen Fragmenten bei konventioneller Färbung (siehe 3.2.1.), der, wie auch im vorausgehenden Kapitel besprochen, eine Zuordnung in die Kategorien ac₁ und ac₂ vorsieht, wird den

tatsächlichen Verhältnissen bei acentrischen Fragmenten nicht gerecht. Aus den Zahlenangaben in Abbildung 4, die über das Auftreten der verschiedenen Aberrationstypen Aufschluß gibt, ist jedoch zu entnehmen, daß bei konventioneller Färbung eine ac_1 -Bewertung sicher vorzuziehen ist. Es wäre hier dringend erforderlich, Dosis-Wirkungsbeziehungen für acentrische Fragmente nach Bandenfärbung mit großen Zellzahlen zu erstellen.

4.2.3. Bruchstellenverteilung

Die bisher mit Bandenmustern erhobenen Befunde über die interchromosomale Verteilung der Bruchstellen nach Einwirkung von Röntgenstrahlen ergab in folgenden Untersuchungen eine nicht zufällige Verteilung (20, 32, 37, 42), was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Allerdings wurde in keiner der oben genannten Veröffentlichungen die entsprechende Aussage durch statistische Berechnungen belegt. Ein Vergleich mit den hier ermittelten Daten ist deshalb schwierig.

An Hand unterschiedlicher Kriterien ohne statistische Grundlagen zeigte sich eine Häufung von Bruchereignissen

- für die Chromosomen Nr. 12, 15 und 17
bei BUCKTON (13),
- für Chromosom Nr. 1 und 7
bei HOLMBERG (32),
- für Chromosom Nr. 2
bei JONASSON (37).

Weniger Brüche als erwartet wurden im Chromosom Nr. 3 (32, 42) und im X-Chromosom (68) beobachtet. Eine auffällige Nichtbeteiligung des X-Chromosoms im Vergleich zu den Autosomen, wie von BEABRIGHT (68) beschrieben, wurde weder hier, noch von BUCKTON (13) gefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Tschebyscheffschen Ungleichung die Übereinstimmung von beobachteten Bruchereignissen mit dem theoretischen Mittelwert ($\bar{X}$) untersucht (29). Dabei ergab sich nur für die Chromosomen Nr. 1 und Nr. 5, daß im Mittel mehr Bruchereignisse zu erwarten sind als $\bar{X}$ angibt. Da bei Anwendung der Tschebyscheffschen Ungleichung auf die normierte Zufallsvariable = $\left(\frac{\text{beobachtete Bruchzahl}}{\text{Gesamtbruchzahl}} \right)$ für $k \sim \sqrt{N}$ gilt, (N = Summe aller beobachteten Bruchereignisse), bedeutet eine hohe Zahl von Bruchereignissen eine kleinere untere Schranke für die Wahrscheinlichkeit P des Auftretens eines bestimmten Bruchereignisses. Im Vergleich zu den von anderen Autoren in ihren Ergebnissen verwendeten Gesamtbruchzahlen (BUCKTON: 428, (13), CASPERSSON: 383, (17), HOLMBERG, JONASSON: 387, (32), JONASSON, HOLMBERG: 389, (37), KUCEROVA: 197, (42) ist hier bei einer Zahl von 793 die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines weit vom theoretischen Wert entfernten beobachteten Wertes sicher kleiner. Das bedeutet, daß bei einer Anwendung der Tschebyscheffschen Ungleichung auf deren Ergebnisse, selbst bei gleicher Entfernung der normierten, beobachteten Bruchzahl von $\frac{\bar{X}}{N}$ wegen eines weit kleineren N auch

eine größere untere Schranke für P zu erwarten wäre.

Während alle bisher vorliegenden Studien in ihren Grundzügen zum selben Ergebnis, dem Auftreten einer nicht zufälligen Verteilung der Brüche kommen, sind die Aussagen über besonders strahlenempfindliche, bzw. strahlenresistente Chromosomen doch sehr unterschiedlich. Ein wesentlicher Grund dafür ist die hier angesprochene mathematisch-statistische Behandlung der Daten, der zudem wegen der bisher allgemein verwendeten geringen Bruchzahlen zwangsläufig schon Grenzen gesetzt sind.

Alle folgenden Ergebnisse stützen sich in dieser Arbeit und in der zitierten Literatur auf prozentuale Aussagen.

Nach BUCKTON (13) verteilen sich 30 % aller Brüche auf die Centromerregionen (jeweils p 11 - Centromer - q 11) (11,3 %) und die Telomerregionen (jeweils die letzte Bande eines Chromosomenarmes, einschließlich "interfaces") (19,5 %). Wenn man diese Definition von Telomer- und Centromerbereichen auf die vorliegenden Zahlen anwendet (Tabelle 6), so findet man 28,9 % aller Brüche in den genannten Abschnitten. 20,9 % entfallen davon auf die Telomer-, 8 % auf die Centromerregionen der Chromosomen.

Sowohl hier als auch bei HOLMBERG (32) und COOKE (20) sind die Sekundäreinschnürungen bei den Chromosomen Nr. 1, 9 und 16 als Bruchorte nicht überrepräsentiert.

Bei der Untersuchung der Bruchstellenverteilung in den Regionen hat die benutzte Bandentechnik großen Einfluß auf das Ergebnis. HOLMBERG (32) findet, daß die Telomerregionen unterrepräsentiert sind, wenn die Bruchstellen mit einer Q-Bandenfärbung analysiert wurden. Da Q-Banden in den Chromosomenenden generell eine schwache Fluoreszenz aufweisen, ist aber eine Bruchlokalisation unter diesen Bedingungen natürlich besonders schwierig.

Für die Untersuchung der Häufigkeit von Bruchereignissen in einzelnen Banden (317 nach Pariser Schema, ohne das Y-Chromosom) konnten hier 625 exakt lokalisierbare Brüche benutzt werden (Tabelle 6 und Abbildung 16).

Am stärksten betroffen sind die Banden 1 p32 (18 x), 1 p13 (13 x), 3 p21 (12 x) und 7 q22 (13 x). Wenn man aber diese Bruchzahlen den Gesamtbruchereignissen im jeweiligen Chromosom gegenüberstellt, so ergibt sich kein eindeutiger Hinweis für eine besonders anfällige Bande. KUCEROVA (42) beschreibt für die Analyse von allerdings nur 197 strahleninduzierten Brüchen die Bande 9 q12 als "the most fragile band", was hier nicht bestätigt werden kann.

JONASSON (37) findet 85 % von 407 beobachteten, strahleninduzierten Brüchen in den positiven R-Banden, welche den negativen G-Banden entsprechen. Auch KUCEROVA (42) nennt einen Anteil von 89,9 % der Brüche in negativen G-Banden. Diese Ergebnisse decken sich mit den eigenen Befunden. Tabelle 8 zeigt, daß 85,28 % der Brüche in den negativen G-Banden zu lokalisieren waren. Für positive R-Banden beschreibt

auch HOLMBERG (32) eine Häufung der Brüche, was einer Bevorzugung der schwach fluoreszierenden Abschnitte bei CASPERSSON (17) entspricht.

Die Annahme, daß die Chromosomenbereiche unterschiedlich gegen Strahlenschädigung geschützt sind (32), wird durch die eigenen Ergebnisse gestützt. Möglicherweise spielen dabei verschieden strukturierte Proteine eine Rolle, die dann auch für die Entstehung des Bandenmusters verantwortlich sein könnten (32).

BUCKTON (13) bestätigt die erhöhte Anfälligkeit der positiven R- und negativen G-Banden für strahleninduzierte Brüche, findet aber auch Bruchorte, die im Grenzbereich ("interfaces") zwischen negativen und positiven Banden liegen, und zwar in 30 % der lokalisierten Brüche. Bisher benutzte allein BUCKTON (13) eine kombinierte G- und R-Bandenfärbung zur Analyse von Chromosomenaberrationen. Angesichts der geringen Ausdehnung vieler Banden und der Schwierigkeit, eine optimale Musterung für eine Bruchlokalisierung zu erreichen, kann über eine Reproduzierbarkeit und Bewertung dieser Befunde im Augenblick noch nichts ausgesagt werden.

4.3. Die Anwendung der Bandenfärbung für eine "biologische Dosimetrie"

In der Einleitung wurden bereits die Probleme erläutert, die bei der Anwendung strahlen-induzierter Chromosomendefekte auf eine "biologische Dosimetrie" auftreten. Eine wesentliche Voraussetzung ist die Ermittlung und mathematische Beschreibung von Dosis-Wirkungsbeziehungen für die verschiedenen Aberrationstypen, denn die daraus resultierenden Dosis-Wirkungskurven werden als Eichkurven für die Dosisabschätzung strahlenexponierter Personen benutzt.

Bisher werden dazu in der Regel Dosis-Wirkungskurven für dicentrische Chromosomen und Ringchromosomen verwendet. Da aber in niederen Dosisbereichen die Aberrationsraten niedrig sind und speziell dicentrische Chromosomen nur in geringer Zahl auftreten, wäre hier eine Verbesserung der Dosisabschätzung mit Hilfe des Gesamtchromosomenschadens denkbar. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, kann mit Hilfe der Bandenfärbung eine exakte Analyse des Karyotyps vorgenommen werden, weil die einzelnen Aberrationstypen sicher zu klassifizieren sind. Damit ist es möglich, für jeden Aberrationstyp eine Dosis-Wirkungskurve zu erstellen. Da auch eine eindeutige Positionierung der Brüche möglich ist, könnte auch der Gesamtschaden, zum Beispiel in Form einer Bruchrate, zu einer Dosisabschätzung herangezogen werden.

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit eine G-Bandenfärbung in Routineuntersuchungen, zum Beispiel im Rahmen der medizinischen Strahlenschutzüberwachung, für eine "biologische Dosimetrie" eingesetzt werden kann.

Selbst bei einer optimalen, gut reproduzierbaren Färbetechnik ist der Zeitaufwand zum Aufsuchen auswertbarer Metaphasen sehr hoch. Auf Grund der verschärften Auswertungskriterien muß eine größere Zahl von Metaphasen durchgemustert werden, als dies nach konventioneller Färbung der Fall ist. Eine Zusammenstellung der hier ausgewerteten Präparate macht das deutlich:

Dosis (rad)	Zahl der aus- werteten Zellen	Zahl der durchge- musterten Präparate
40	146	5
80	117	14
120	121	7
160	108	8
200	103	10
240	160	10
280	75	8

Bei durchschnittlicher Mitoserate genügen nach konventioneller Färbung dagegen 1-2 Präparate für 100 Zellen.

Die Chromosomenanalyse kann praktisch nur nach Karyogrammen durchgeführt werden. Dazu müssen die Zellen fotografiert, die Chromosomen ausgeschnitten, geordnet und geklebt werden. Zur Erfassung von Strukturumbauten (symmetrische Translokationen, Inversionen) müßten trotz Bandenfärbung wohl alle Zellen karyotypiert werden. Der Zeitaufwand erhöht sich dadurch erheblich.

Wenn man bedenkt, daß für statistisch gut gesicherte Dosis-Wirkungskurven in vitro im allgemeinen 2000-3000 Zellen benötigt werden, so steht wohl der Zeitaufwand in keinem Verhältnis zum Nutzen, selbst wenn man durch die Bandenanalyse die gesamten Aberrationen erfaßt hätte. Die Dosisabschätzung einer Strahlenexposition in vivo müßte nämlich unter den gleichen Voraussetzungen durchgeführt werden. Da man hierzu bei Expositionen einzelner Personen im niederen Dosisbereich (< 50 rad) etwa 1000-2000 Zellen, im höheren Dosisbereich immerhin noch einige hundert Zellen analysieren muß, scheint die Bandenfärbung für den Routineeinsatz zumindest im Augenblick nicht praktikabel.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß selbst unter der Einschränkung der hier analysierten, vergleichsweise niedrigen Zellzahlen die Befunde für dicentrische Chromosomen mit beiden Färbetechniken zu identischen Ergebnissen führten. Das bedeutet, daß Dosisabschätzungen, die nach konventioneller Färbung mit Hilfe dieses Aberrationstyps durchgeführt werden, nach Banden-

färbung kaum verbessert werden. Diese Feststellung sollte jedoch unter Verwendung von größeren Zellzahlen noch eingehender geprüft werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Es wurde eine reproduzierbare G-Bandenfärbung ermittelt, die eine sichere Einordnung der Chromosomen in ein Karyogramm ermöglicht. Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur ergab sich, daß für die Entstehung von Banden vor der eigentlichen Färbung keine zusätzlichen Reagenzien angewandt werden müssen.
- 2) Nach Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen wurden vergleichende Chromosomenanalysen bei jeweils 830 Zellen nach G-Bandenfärbung und konventioneller Färbung durchgeführt.
- 3) Bei der Analyse atypischer, durch Strukturumbauten entstandener Chromosomenaberrationen (symmetrische Translokationen, Inversionen) ist die Bandenfärbung der konventionellen Färbung eindeutig überlegen. Mit konventioneller Färbung werden nur 1/10 dieser Figuren erfaßt.
- 4) Mit Hilfe der Bandenfärbung gelingt eine eindeutige Klassifizierung acentrischer Fragmente. Intrachanges treten überwiegend als terminale Deletionen auf. Unsymmetrische Interchanges kommen hauptsächlich als komplette Formen, also mit nur einem acentrischen Fragment vor.
- 5) Die Beschreibung der empirischen Daten mit grundlegenden Modellen der Dosis-Wirkungsbeziehung gelang für dicentrische Chromosomen und acentrische Fragmente mit einer Potenzfunktion.
Die Dosis-Wirkungskurven für dicentrische Chromosomen waren nach beiden Färbetechniken nicht signifikant voneinander verschieden. Sie stimmen

auch mit jener Kurve überein, die aus früheren Experimenten dieser Arbeitsgruppe hervorgegangen ist. Wegen der unterschiedlichen Entstehungsweise acentrischer Fragmente ist eine eindeutige Beschreibung der Dosis-Wirkungsbeziehung auf der Grundlage der hier verwendeten Zellzahlen noch nicht möglich.

- 6) Bei der Analyse strahleninduzierter Chromosomenaberrationen ist die Bandenfärbung Voraussetzung für die Untersuchung der Bruchstellenverteilung. Diese ergab hier eine nichtzufällige, inter- und intrachromosomale Verteilung. Eine statistische Analyse ergab nur für die Chromosomen Nr. 1 und Nr. 5, daß im Mittel mehr Bruchereignisse zu erwarten sind als der theoretische Mittelwert angibt. Bei den Chromosomenarmen zeigte sich allein bei Chromosom Nr. 1 im kurzen Arm eine Unvereinbarkeit des beobachteten mit dem theoretischen Wert.

Mit Ausnahme der Chromosomen Nr. 9, Nr. 13 und Nr. 14 wurde eine Tendenz zur Bevorzugung der Telomerregionen des langen Armes gefunden. 85 % der Brüche lagen in negativen Banden. Nur bei Chromosom Nr. 12 waren sie auf negative und positive Banden annähernd gleich verteilt.

- 7) Im Hinblick auf eine Verwendung der Bandenfärbung zu einer verbesserten "biologischen Dosimetrie" läßt sich sagen, daß diese Technik für den Routineeinsatz in der medizinischen Strahlenschutzüberwachung wegen des erheblichen Zeitaufwandes im Augenblick nicht praktikabel ist.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ARAKAKI, D.T., SPARKES, R.S.:
Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood.
Cytogenetics 2, 57-60 (1963).
2. ARRIGHI, F.E., HSU, T.C.:
Lokalisation of heterochromatin in human chromosomes.
Cytogenetics 10, 81-86 (1971).
3. AULA, P., SAKSELA, E.:
Banding characteristics of paracentric marker constrictions in human chromosomes.
Hereditas 70, 309-310 (1972).
4. AULA, P., SAKSELA, E.:
Comparison of areas of quinacrine mustard fluorescence and modified Giemsa staining in human metaphase chromosomes.
Exp. Cell Res. 71, 161-167 (1972).
5. AYMÉ, S., MATTEI, J.F., MATTEI, M.G., AURRAN, Y., GIRRAND, F.:
Nonrandom distribution of chromosome breaks in cultured lymphocytes of normal subjects.
Hum. Genet. 31, 161-175 (1976).
6. BAUCHINGER, M.:
Chromosomenaberrationen in menschlichen peripheren Lymphocyten nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen und Endoxan.
Habilitationsschrift, GSF-Bericht B 309 (1971).

7. BAUCHINGER, M.:
Strahelninduzierte Chromosomenaberrationen.
Sonderdruck aus: Handbuch der medizinischen
Radiologie. Springer-Verlag, Berlin (1972).
8. BAUCHINGER, M., SCHMID, E.:
Chromosome aberrations in human lymphocytes
after X-irradiation in vitro.
Mut. Res. 20, 107-113 (1973).
9. BENDER, M.A., GOOCH, P.C.:
Types and rates of X-ray induced chromosome
aberrations in human blood irradiated in vitro.
Proc. nat. Acad. Sci. 48, 522-532 (1962).
10. BHASIN, M.K., FOERSTER, W.:
A simple banding technique for identification
of human metaphase chromosomes.
Humangenetik 14, 247-250 (1972).
11. BOSMAN, F.T., SCHABERG, A.:
A new G-banding modification for metaphase
chromosomes.
Nat. New Biol. 241, 216-217 (1973).
12. BUCKTON, K.E., EVANS, H.J.:
Methods for the analysis of human chromosome
aberrations.
World Health Organisation, Genf (1973).
13. BUCKTON, K.E.:
Identification with G- and R-banding of the
position of breakage points induced in human
chromosomes by in vitro X-irradiation.
Int. J. Radiat. Biol. 29, No.5, 475-488 (1976).

14. CASPERSSON, T., ZECH, L., MODEST, E.J.,
FOLEY, G.E., WAGH, U., SIMONSSON, E.:
Chemical differentiation with fluorescent
alkylating agents in *Vicia faba* metaphase
chromosomes.
Exp. Cell Res. 58, 128-140 (1969).

15. CASPERSSON, T., ZECH, L., JOHANSSON, C.:
Differential binding of alkylating fluoro-
chromes in human chromosomes.
Exp. Cell Res. 60, 315-319 (1970).

16. CASPERSSON, T., ZECH, L., RUNNSTRÖM-REIC, V.:
Chromosome identification - technique and
applications in biology and medicine.
Nobel Symposium 23, Academic Press,
New York and London (1973).

17. CASPERSSON, T., HAGLUND, U., LINDELL, B.,
ZECH, L.:
Radiation induced non random chromosome breakage.
Exp. Cell Res. 75, 541-543 (1972).

18. CHAUDHURI, J.P., VOGEL, W., VOICULESCU, I.,
WOLF, U.:
A simplified method of demonstrating Giemsa-banding
pattern in human chromosomes.
Humangenetik. 14, 83-84 (1971).

19. CHRZ, R., KOZAK, J., MALKOVA, J.:
The densitometric study of G-bands in human
metaphase chromosomes.
Humangenetik 18, 221-231 (1973).

20. COOKE, P., SEABRIGHT, M., WHEELER, M.:
The differential distribution of X-ray induced chromosome lesions in trypsin banded preparations from human subjects.
Humangenetik 28, 221-231 (1975).
21. CRAIG-HOLMES, A.P., SHAW, A.P.:
Polymorphism of human constitutive heterochromatin.
Science 174, 702-704 (1971).
22. DENVER CLASSIFICATION:
A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes.
Lancet 1, 1063 (1960).
23. DRETS, M.E., SHAW, M.W.:
Specific banding pattern of human chromosomes.
Proc. nat. Acad. Sci. 68, No.9, 2073-2077 (1971).
24. DUTRILLAUX, B., FINAZ, C., DE GROUCHY, I., LEJEUNE, I.:
Comparison of banding patterns of human chromosomes obtained with heating, fluorescence and proteolytic digestion.
Cytogenetics 11, 113-116 (1972).
25. EBERT, M., HOWARD, A.:
Current topics in radiation research. Vol. VI.
North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London (1970).
26. EIBERG, H.:
New selective Giemsa technique for human chromosomes, C_d staining.
Nat. 248, 55 (1974).

27. FAUST, J., VOGEL, W.:
Are 'N-bands' selective staining of specific heterochromatin?
Nat. 249, 352-353 (1974).
28. FINAZ, C., DE GROUCHY, J.:
Identification of individual chromosomes in the human karyotype by their banding pattern after proteolytic digestion.
Humangenetik 15, 249-252 (1972).
29. FISZ, M.:
Wahrscheinlichkeitsrechnung und mathematische Statistik.
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaft, 68 ff. (1970).
30. GALLIMORE, P.H., RICHARDSON, C.R.:
An improved banding technique exemplified in the karyotype analysis of two strains of rat.
Chromosoma 41, 259-263 (1973).
31. GRZESCHIK, K.H., KIM, M.A., JOHANNSMANN, R.:
Late replicating bands of human chromosomes demonstrated by fluorochrome and Giemsa staining.
Chromosoma 38, 105-120 (1972).
32. HOLMBERG, M., JONASSON, J.:
Preferential location of X-ray induced chromosome breakage in the R-bands of the human chromosomes.
Hereditas 74, 57-68 (1973).
33. HOLMBERG, M., JONASSON, J.:
Synergistic effect of X-ray and UV irradiation on the frequency of chromosome breakage in human lymphocytes.
Mut. Res. 23, 213-221 (1974).

34. HOWARD, P.N., STODDARD, G.R., SEELY, I.R.:
Giemsa banding of a human metacentric chromosome
number 9.
Humangenetik 18, 271-272 (1973).
35. HUNGERFORD, D.A.:
Leucocytes cultured from small inocula of whole
blood and the preparation of metaphase chromoso-
mes by treatment with hypotonic KCl.
Stain Technol. 40, 233-237 (1965).
36. JAKOBS, P.A., BUCKTON, K.E., CUNNINGHAM, C.,
NEWTON, M.:
An analysis of the break points and structural
rearrangements in man.
Jour. of Med. Genet. 11, 50-64 (1974).
37. JONASSON, J., HOLMBERG, M.:
Evidence for an inverse relationship between
X-ray induced chromatid and chromosome breakage
in human chromosomes.
Hereditas 75, 259-266 (1973).
38. KATO, H., MORIWAKI, K.:
Factors involved in the production of banded
structures in mammalian chromosomes.
Chromosoma 38, 105-120 (1972).
39. KIM, MY.A.:
Identification and characterisation of hetero-
chromatic regions in the human metaphase and
interphase nucleus.
Humangenetik 21, 331-340 (1974).

40. KIM, MY.A., PFEIFFER, R.A.:
Die Heterochromatinverteilung der menschlichen
Metaphasechromosomen.
Humangenetik 14, 128-132 (1972).
41. KLINGER, H.P.:
Processing embryos for chromosome banding.
Cytogenetics 11, 424- 435 (1972).
42. KUCEROVA, M., POLIVKOVA, Z.:
Banding technique used for the detection of
chromosomal aberrations induced by radiation
and alkylating agents.
Mut. Res. 34, 279-290 (1976).
43. LEA, C.L., WELCH, J.P., WINSOR, E.J.T.:
Banding patterns in human chromosomes:
Production by proteolytic enzymes.
Jour. of Her. 63, 296-297 (1972).
44. LIN, C.C., VAN DE SANDE, H., SMINK, W.K.,
NEWTON, D.R.:
Quinacrine fluorescence and Q-banding patterns
of human chromosomes.
Can. J. Genet. Cytol. 17, 81-92 (1975).
45. LOMHOLT, B., MOHR, J.:
Human karyotyping by heat Giemsa staining and
comparison with fluorochrome technique.
Nat. New Biol. 234, 109-110 (1971).
46. MC KENZIE, W.H., LUBS, H.A.:
An analysis of the technical variations in the
productions of C-bands.
Chromosoma 41, 175-182 (1973).

47. MC KAY, R.D.G.:
The mechanism of G- and C-banding in metaphase
chromosomes.
Chromosoma 44, 1-14 (1973).
48. MEISNER, L.F., CHUPREVICH, T.W., INHORN, S.L.:
Giemsa banding specificity.
Nat. new Biol. 245, 145-147 (1973).
49. MIKKELSEN, M., DYGGVE, H.:
(6;15) translocation with loss of chromosome
material in the patient and various chromosome
aberrations in family members.
Humangenetik 18, 195-202 (1973).
50. MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J.,
BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A.:
Chromosome preparations of leukocytes cultured
from human peripheral blood.
Exp. Cell Res. 20, 613-616 (1960).
51. NORMAN, A., SASAKI, M.S., OTTOMAN, R.E., VEOMETT,
R.C.:
The frequency of dicentrics in human leukocytes
irradiated in vivo and in vitro.
Radiologie 83, 108-110 (1964).
52. OSZTOVIES, M., BÜHLER, E.M., MÜLLER, H., STADLER,
G.R.:
Banding technique in the evaluation of human
chromosomal variants.
Humangenetik 18, 123-128 (1973).
53. PARDUE, M.L., GALL, J.G.:
Chromosomal localization of mouse satellite DNA.
Science 168, 1356-1358 (1970).

54. PARIS CONFERENCE 1971:
Standardization in human cytogenetics.
Birth defects: Original article series, VIII, 7.
The National Foundation, New York (1972).
55. PATIL, S.R., MERRICK, S., LURS, H.A.:
Identification of each human chromosome with
a modified Giemsa stain.
Science 173, 821-822 (1971).
56. RAY, M., CANNING, N., HAMERTON, J.L.:
The human complement after trypsin pretreatment
as compared to the Paris standard.
Humangenetik 29, 29-34 (1975).
57. SANCHEZ, O., YUNIS, J.:
The relationship between repetitive DNA and
chromosomal bands in man.
Chromosoma 48, 191-202 (1974).
58. SAN ROMAN, C., BOBROW, M.:
The sites of radiation induced breakage in human
lymphocyte chromosomes, determined by quinacrine
fluorescence.
Mut. Res. 18, 325-331 (1973).
59. SCHERES, I.M.I.C.:
Production of C- and T-bands in human chromosomes
after heat treatment at high pH and staining with
"Stains-All".
Humangenetik 23, 311-314 (1974).
60. SCHESTED, J.:
A simple method for R-banding of human chromosomes
showing a pH-dependant connection between R and G
bands.
Humangenetik 21, 55-58 (1974).

61. SCHMID, E., BAUCHINGER, M.:
Inter- und intrachromosomale Verteilung von
Cyclophosphamid-induzierten Chromosomendefek-
ten beim Menschen.
Mut. Res. 9, 417-424 (1970).
62. SCHMID, E., BAUCHINGER, M., HUG, O.:
Chromosomenaberrationen menschlicher Lympho-
zyten nach Röntgenbestrahlung in vitro.
I. Qualitative und quantitative Aspekte der
Dosis-Wirkungsbeziehung.
Mut. Res. 16, 307-317 (1972).
63. SCHNEEBERGER, H.:
Linearitätsteste der k-dimensionalen Regressions-
gleichung und Anwendungen.
Monatshefte für Mathematik 64, 361-373 (1960).
64. SCHNEDL, W.:
Analysis of human karyotype using a reassociation
technique.
Chromosoma 34, 448-454 (1971).
65. SCHUH, B., KORF, B.R., SALWEN, M.J.:
Dynamic aspects of trypsin-Giemsa banding.
Humangenetik 28, 233-237 (1975).
66. SEABRIGHT, M.:
The use of proteolytic enzymes for the mapping
of structural rearrangements in the chromosomes
of man.
Chromosoma 36, 204-210 (1972).
67. SEABRIGHT, M.:
High resolution studies on the pattern of induced
exchanges in the human karyotype.
Chromosoma 40, 333-346 (1973).

68. SEABRIGHT, M.:
Noninvolvement of the human X chromosome in
X-ray induced exchanges.
Cytogenet. Cell Genet. 12, 342-356 (1973).
69. SEABRIGHT, M., COOKE, P., WHEELER, M.:
Variation in trypsin banding at different stages
of concentration in human chromosomes and the
definition, by measurement, of the "average"
karyotype.
Humangenetik 29, 35-40 (1975).
70. SPERLING, K., WIESNER, R.:
A rapid banding technique for routine use in
human and comparative cytogenetics.
Humangenetik 15, 349-353 (1972).
71. SELLES, W.D., MARIMUTHU, K.M., NEURATH, P.W.:
Variations in normal human chromosomes.
Humangenetik 22, 1-15 (1974).
72. SUMNER, A.T., EVANS, H.I., BUCKLAND, R.A.:
New technique for distinguishing between human
chromosomes.
Nat. New Biol. 232, 31-32 (1971).
73. SUMNER, A.T., EVANS, H.I.:
Mechanisms involved in the banding of chromosomes
with quinacrine and Giemsa.
I. The effects of fixation in methanol-acetic acid.
Exp. Cell Res. 81, 214-222 (1973).
74. SUMNER, A.T., EVANS, H.I.:
Mechanisms involved in the banding of chromosomes
with quinacrine and Giemsa.
II. The interaction of the dyes with the chromosomal
components.
Exp. Cell Res. 81, 223-236 (1973).

75. SUMNER, A.T.:
Involvement of protein disulphides and sulph-
hydryls in chromosome banding.
Exp. Cell Res. 83, 438-442 (1973).
76. SUN, N.C., CHANG, E.H.Y., CHANG, C.C.:
Staining method for the banding patterns of human
mitotic chromosomes.
Mammalian Chromosomes Newsletter 14, No. 1.,
26-27 (1973).
77. VAN STEENIS, H., TUSCANY, R., LEIGH, B.:
The distribution of X-ray induced chromosomal
abnormalities in Rat Kangaroo (Potorous tridactylus)
cells in vitro.
Mut. Res. 23, 223-228 (1974).
78. VASS, L., SELLYEI, M.:
Heated Giemsa solution for producing more con-
sistent bands on mammalian chromosomes.
Humangenetik 18, 81-83 (1973).
79. WALTHER, J.-U., STENGEL-RUTKOWSKI, S., MURKEN, J.D.:
Observations with G-banding of human chromosomes.
Humangenetik 25, 49-51 (1974).
80. YUNIS, J.J., SANCHEZ, O.:
G-banding and chromosome structure.
Chromosoma 44, 15-23 (1973).
81. YUNIS, J.J., SANCHEZ, O.:
The G-banded prophase chromosome of man.
Humangenetik 27, 167-172 (1975).

LEBENS LAUF

Am 17. Februar 1947 wurde ich als zweites Kind meiner Eltern, Mia Wehner, geb. Porzel und Bruno Wehner, in Würzburg geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Würzburg-Heidingsfeld und Würzburg, anschließend die Mozartschule, ein neusprachliches Gymnasium für Mädchen, in Würzburg, wo ich 1967 die Reifeprüfung bestand.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Biologie und Chemie an der Universität Würzburg. Im Sommersemester 1970 legte ich die Vorprüfung für Diplombiologen ab und studierte ein Semester (Wintersemester 1970 /71) an der Universität Heidelberg. Nach dem Sommersemester 1972 bestand ich die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in Würzburg.

Unterstützt von einem Stipendium der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, begann ich im Mai 1973 am Strahlenbiologischen Institut der Universität München mit den experimentellen Arbeiten für die Dissertation.

Am 15. September 1975 trat ich den Vorbereitungsdienst für das Höhere Lehramt am Dürer-Gymnasium in Nürnberg an. Im Juni 1977 bestand ich die Pädagogische Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in Nürnberg.

Am 14. Oktober 1977 heiratete ich in Würzburg Bernhard Götz.

Berhard Götz

Druck:

**SATZ
DRUCK
SHOP**

Franz-Ludwig-Str. 10
8700 Würzburg
Tel.: 0931/8 63 55